

GeneXpert[®]
Powered By CEPHEID INNOVATION

Xpert[®] HemosIL[®] Factor II & Factor V

REF GXFIIFV-10



Cepheid.



Instrumentation Laboratory

For *In Vitro* Diagnostic Use Only



300-8501 Rev D, September 2011

© Cepheid. The Cepheid logo, Cepheid®, GeneXpert®, and Xpert® are trademarks of Cepheid.

This product is manufactured and sold under license from bioMérieux SA under US patents 6,043,035 and 6,518,016 and counterpart patents worldwide.

This product is made and sold under license from DxS Limited under US Patent No. 6,326,145 and counterpart patents worldwide.

NO OTHER RIGHTS ARE CONVEYED EXPRESSLY, BY IMPLICATION OR BY ESTOPPEL TO ANY OTHER PATENTS. FURTHERMORE, NO RIGHTS FOR RESALE ARE CONFERRED WITH THE PURCHASE OF THIS PRODUCT.

HemosIL® is a registered trademark of Instrumentation Laboratory.

English

For *In Vitro* Diagnostic Use Only

Proprietary Name

Xpert® HemosIL® FII & FV

Common or Usual Name

Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay

Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Intended Use

The Xpert® HemosIL Factor II & Factor V Assay is a qualitative *in vitro* diagnostic genotyping test for the detection of Factor II and Factor V alleles from sodium citrate or EDTA anticoagulated whole blood. The test is performed on the Cepheid GeneXpert® Dx System. This test is intended to provide results for Factor II (G20210A) and Factor V Leiden (G1691A) mutations as an aid in the diagnosis in individuals with suspected thrombophilia.

Summary and Explanation

The association of Factor II (G20210A) and Factor V Leiden (G1691A) mutations with an increased risk for venous thrombosis has been well documented.^{1, 2, 3, 4} The Factor II or Prothrombin (G20210A) mutation refers to the G to A transition at nucleotide 20210 in the 3' untranslated region of the gene and is associated with increased plasma levels of prothrombin. Factor V Leiden (G1691A) refers to the G to A transition at nucleotide position 1691 of the Factor V gene, resulting in the substitution of the amino acid arginine by glutamine in the Factor V protein, causing resistance to cleavage by Activated Protein C (APC).

Factor II (G20210A) and Factor V Leiden (G1691A) mutations are present in 2% and 5% of the general population, respectively.⁷

Principle of the Procedure

The GeneXpert Dx System automates and integrates sample purification, nucleic acid amplification, and detection of the target sequence in whole blood using real-time PCR assays. The system consists of an instrument, personal computer, handheld barcode scanner, and preloaded software for running tests and viewing the results. The system requires the use of single-use disposable cartridges that hold the PCR reagents and host the PCR process. Because the cartridges are self-contained, cross-contamination between samples is eliminated. For a full description of the system, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

The Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay includes reagents for the detection of Factor II and Factor V normal and mutant alleles from sodium citrate or EDTA anticoagulated whole blood. Each assay cartridge also contains a Probe Check Control (PCC) that verifies reagent rehydration, PCR tube filling in the cartridge, probe integrity, and dye stability.

The primers and probes in the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay determine the genotype of the Factor II gene (at position 20210) and/or the Factor V gene (at position 1691).

Reagents and Instruments

Material Provided

 The Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay kit contains sufficient reagents to process 10 specimen or quality control samples. The kit contains the following:

- Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay Cartridges with integrated reaction tubes 10
- Bead 1 (freeze-dried) 1 per cartridge
 - Polymerase
 - dNTPs
 - Bovine Serum Albumin (BSA)
- Bead 2 (freeze-dried) 1 per cartridge
 - Primers
 - Probes
 - BSA
- Reagent 1 (Tris Buffer, EDTA, Tween® 20) (TET) 3.0 mL per cartridge
- Reagent 2 (Tris Buffer, GHCl, Sarkosyl, Tween 20) (GHCl) 3.0 mL per cartridge
- CD
 - Assay definition file (ADF)
 - Instructions to import ADF into GX software
 - Package Insert

Storage and Handling

-  • Store the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay cartridges and reagents at 2-28 °C.
- Do not use cartridges that have passed the expiration date.
 - Do not open a cartridge until you are ready to perform testing.
 - Use the cartridge within 30 minutes after opening the lid.

Materials Required but Not Provided

- GeneXpert Dx System (catalog number varies by configuration): GeneXpert instrument, computer, barcode scanner and *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

Note: The GeneXpert Dx System catalog number varies by configuration. Contact Cepheid for the desired configuration and corresponding catalog number.

- GeneXpert Dx Software version 4.0 or higher.
- Pipette to dispense 50 µL sodium citrate or EDTA anticoagulated blood with aerosol-resistant filter tips.
- HemosIL FII & FV DNA Control, P/N 0020003500.

Warnings and Precautions

-  • Harmful if swallowed (R22), Irritating to eyes and skin (R36/38).
-  • Treat all biological specimens, including used cartridges, as if capable of transmitting infectious agents. Because it is often impossible to know which might be infectious, all biological specimens should be treated with universal precautions. Guidelines for specimen handling are available from the U.S. Centers for Disease Control and Prevention⁵ and the Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards)⁶.
- Follow your institution's safety procedures for working with chemicals and handling biological samples.
 - Use the cartridges before the expiration date indicated on the kit.
 - Do not open the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay cartridge lid except when adding sample.
 - Do not use a cartridge that has been dropped or shaken after you have added the sample.
 - Do not use a cartridge that has a damaged (e.g., bent or broken) reaction tube.
-  • Each single-use Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay cartridge is used to process one test. Do not reuse spent cartridges.

- Consult your institution's environmental waste personnel on proper disposal of used cartridges and unused reagents. This material may exhibit characteristics of federal EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) hazardous waste requiring specific disposal requirements. Check state and local regulations as they may differ from federal disposal regulations. Institutions outside the USA should check their country hazardous waste disposal requirements.
- Store the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay kit at 2-28 °C.
- Do not open a cartridge lid until you are ready to perform testing.
- In the event the internal pressure rises above the pre-set manufacturer limit, the run will automatically abort and an ERROR result will be reported.
- Material Safety Data Sheets (MSDS) for all reagents provided with this assay are available upon request from Cepheid Technical Support, and are available on Cepheid's websites (www.cepheid.com and www.cepheidinternational.com).
- The bovine serum albumin (BSA) in this product was produced exclusively from bovine plasma sourced in the United States. The manufacturing of the BSA is also performed in the United States. No ruminant protein or other animal protein was fed to the animals; the animals passed ante- and post-mortem testing. During processing, there was no commingling of the material with other animal materials.

Specimen Collection and Transport



To obtain adequate specimen, follow the instructions in this section closely.

1. Only trained, licensed professionals should draw blood in EDTA or sodium citrate anticoagulant tubes.
2. Do not centrifuge or concentrate the blood sample by plasma removal.
3. Blood should be processed within 24 hours when stored at room temperature (22-28 °C). Samples should be stored at 2-8 °C if stored longer than 24 hours. Blood is stable up to 15 days when stored at 2-8 °C. The blood samples may also be stored at -20 °C or -80 °C for up to 3 months. Use of a freezer-compatible storage vial is recommended.

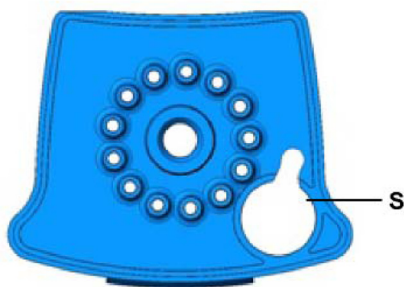
Allow frozen blood to thaw completely at room temperature. It is not recommended to freeze/thaw blood more than one time.

4. Mix sample by inverting 5 times prior to dispensing into the cartridge.

Procedure

Preparing the Cartridge

Important: Start the test within 15 minutes of adding the sample to the cartridge.



S = Sample

Figure 1. Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay Cartridge (top view)

To add the sample into the cartridge:

1. Remove the cartridge from the kit.
2. It is not necessary to bring the cartridge to room temperature before use.
3. Mix sample by inverting the tube multiple times, until homogeneous.
4. Open the cartridge lid. Using a pipette with an aerosol resistant tip, transfer 50 µL of sodium citrate or EDTA anticoagulated blood to the bottom wall of the "S" opening of the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay cartridge.
5. Close the cartridge lid.

Starting the Test

Important: Before you start the test, make sure the Xpert HemosIL FII, Xpert HemosIL FV, and Xpert HemosIL FII & FV Combo Assay definition files are imported into the software. The assay definition files are on the supplied CD.

This section lists the basic steps to run the assay. For detailed instructions, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

1. Turn on the GeneXpert Dx instrument and then turn on the computer, the GeneXpert software will launch automatically.
2. Log on to the GeneXpert Dx System software using your user name and password.
3. In the GeneXpert Dx System window, click **Create Test**. The Create Test window appears.
4. Scan barcode on cartridge.
5. In the **Sample ID** box, type the sample ID. Make sure you type the correct sample ID. Alternatively, scan the sample barcode. The sample ID is associated with the test results and is shown in the **View Results** window and all the reports.

Name	Version
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FV	1
Xpert HemosIL FII & FV Combo	1

Figure 2. Create Test window

6. From the **Select Assay** drop-down menu, select the appropriate assay to be run.
7. Click **Start Test**. In the dialog box that appears, type your password.
8. Open the instrument module door with the blinking green light and load the cartridge.
9. Close the door. The test starts and the green light stops blinking. When the test is finished, the light turns off.
10. When the system releases the door lock, open the module door and remove the cartridge.
11. Dispose of the used cartridges in the appropriate specimen waste containers, according to your institution's standard practices.

Viewing and Printing Results

For detailed instructions on how to view and print the results, see the *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

CONTROL Quality Control

Each test includes a probe check (PCC).

Probe check control (PCC)—Before the start of the PCR reaction, the GeneXpert Dx System measures the fluorescence signal from the probes to monitor bead rehydration, reaction-tube filling, probe integrity and dye stability. Probe Check passes if it meets the assigned acceptance criteria.

External Controls - HemosIL FII & FV DNA Control P/N 0020003500 has been designed and validated for the External QC program of Xpert HemosIL FII & FV Assay.

Alternatively, Normal, heterozygous, or homozygous Factor II/Factor V whole blood samples (sodium citrate or EDTA anticoagulant) may also be used for training, proficiency testing, and external QC of the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay. Cell-based material is required. Do not use extracted DNA. External controls may be used in accordance with local, state, and federal accrediting organizations, as applicable.

Interpretation of Results

The results are interpreted by the GeneXpert Dx System from measured fluorescent signals and embedded algorithms to identify genotypes, and are shown in the following View Results windows:

For Xpert HemosIL FII Results (figures 3 through 5).

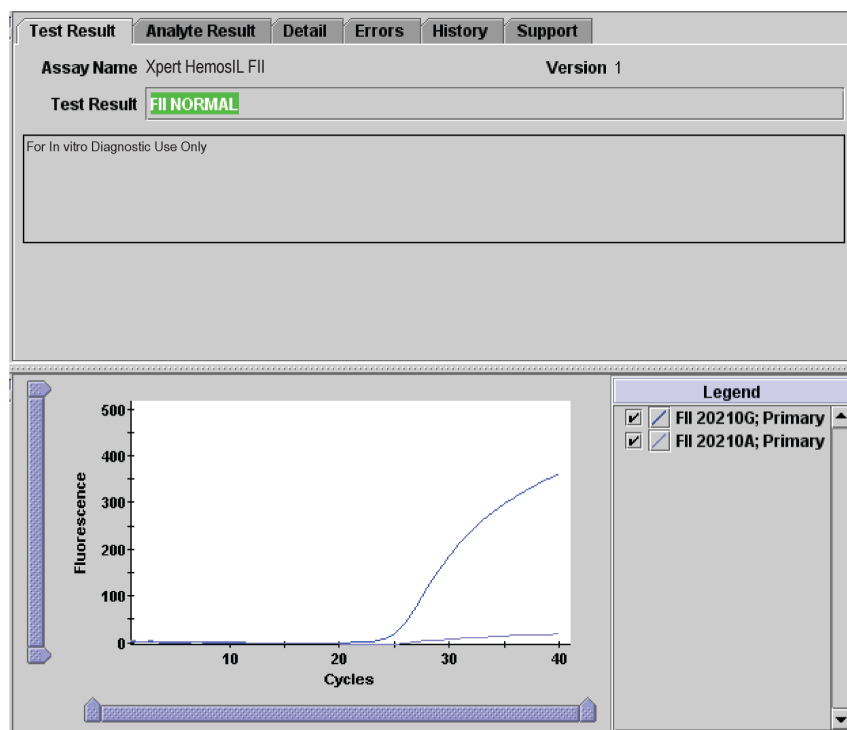


Figure 3. GeneXpert Dx System—View Results window, Factor II normal result

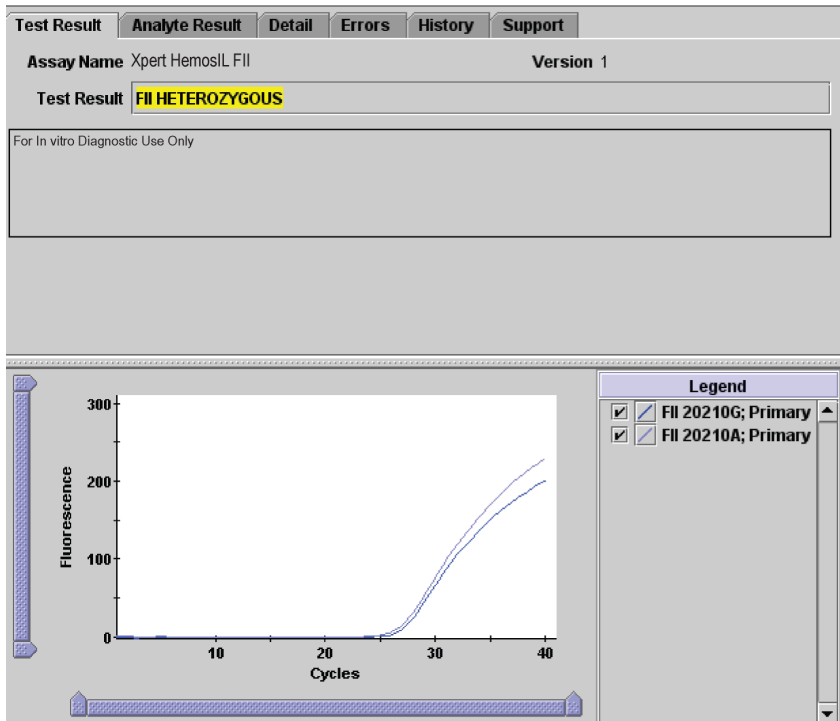


Figure 4. GeneXpert Dx System—View Results window, Factor II heterozygous result

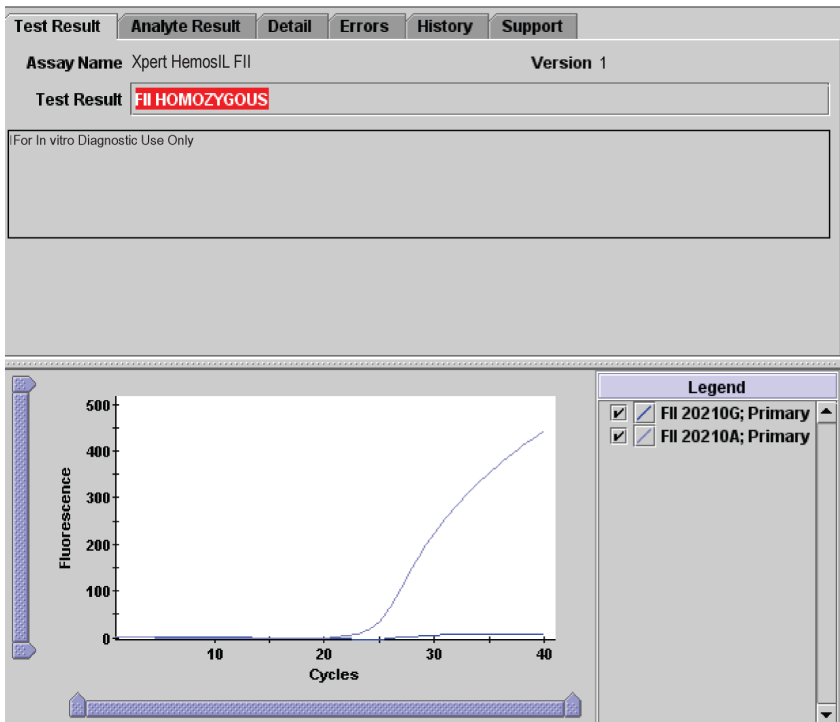


Figure 5. GeneXpert Dx System—View Results window, Factor II homozygous result

For Xpert HemosIL FV Results (figures 6 through 8).

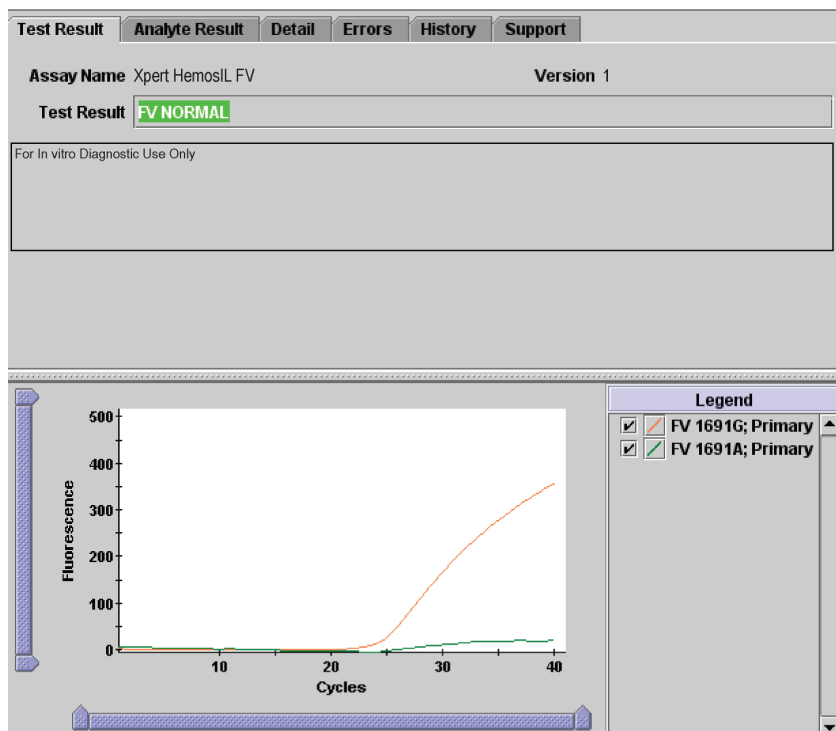


Figure 6. GeneXpert Dx System—View Results window, Factor V normal result

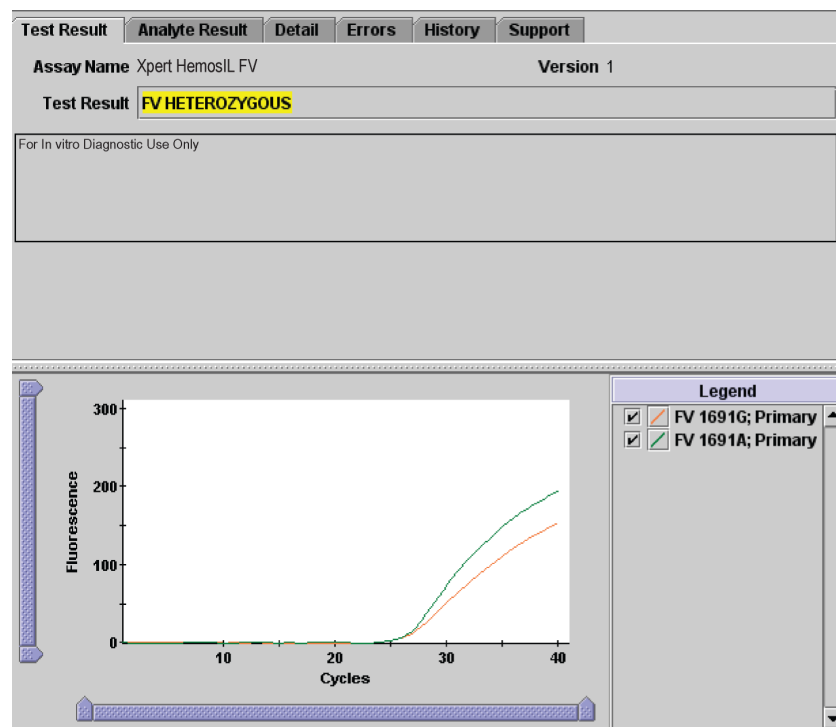


Figure 7. GeneXpert Dx System—View Results window, Factor V heterozygous result

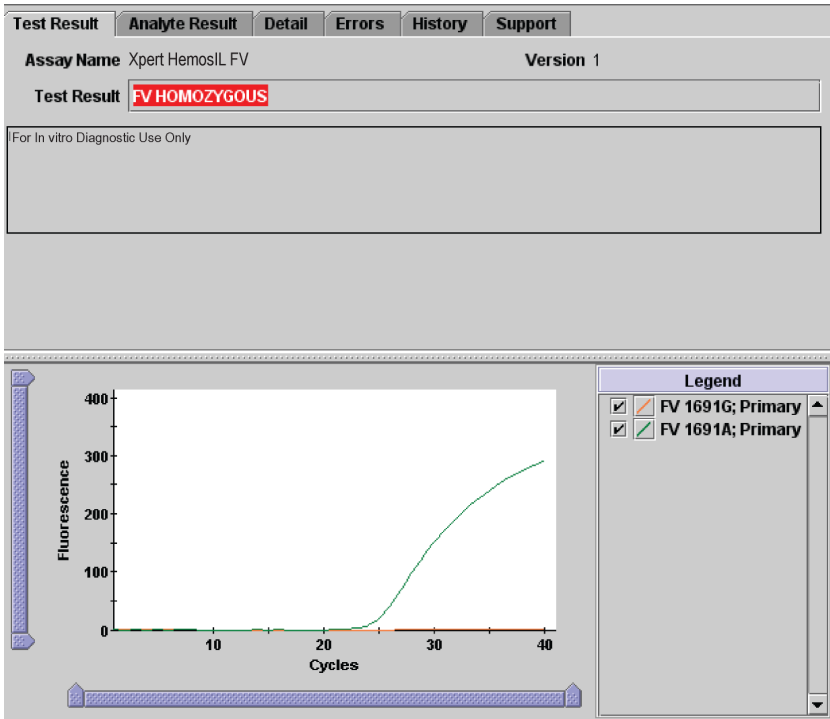


Figure 8. GeneXpert Dx System—View Results window, Factor V homozygous result

For Xpert HemosIL FII & FV Combo Results (figures 9 through 11).

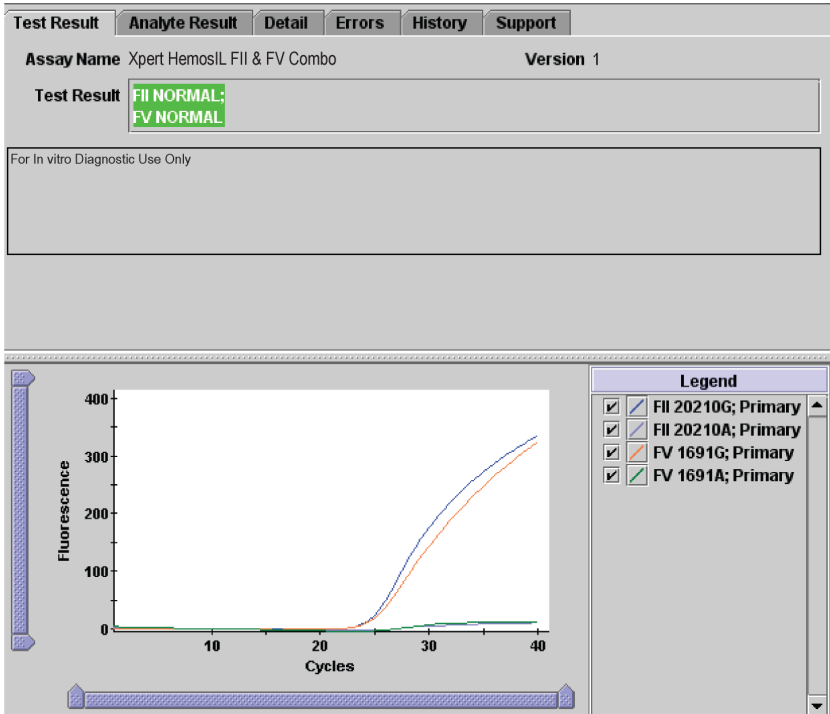


Figure 9. GeneXpert Dx System—View Results window, FII & FV normal result

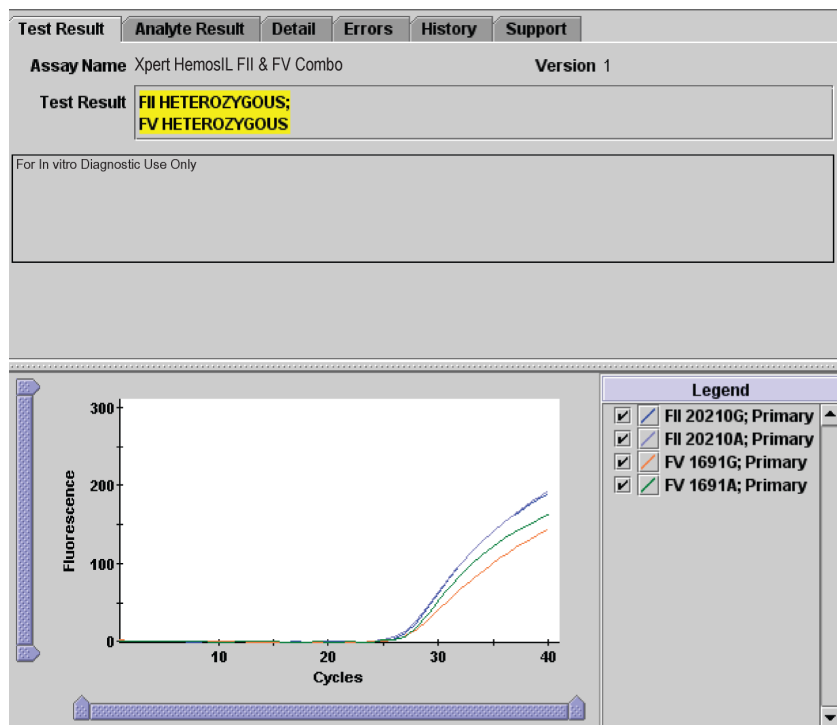


Figure 10. GeneXpert Dx System—View Results window, FII & FV heterozygous result

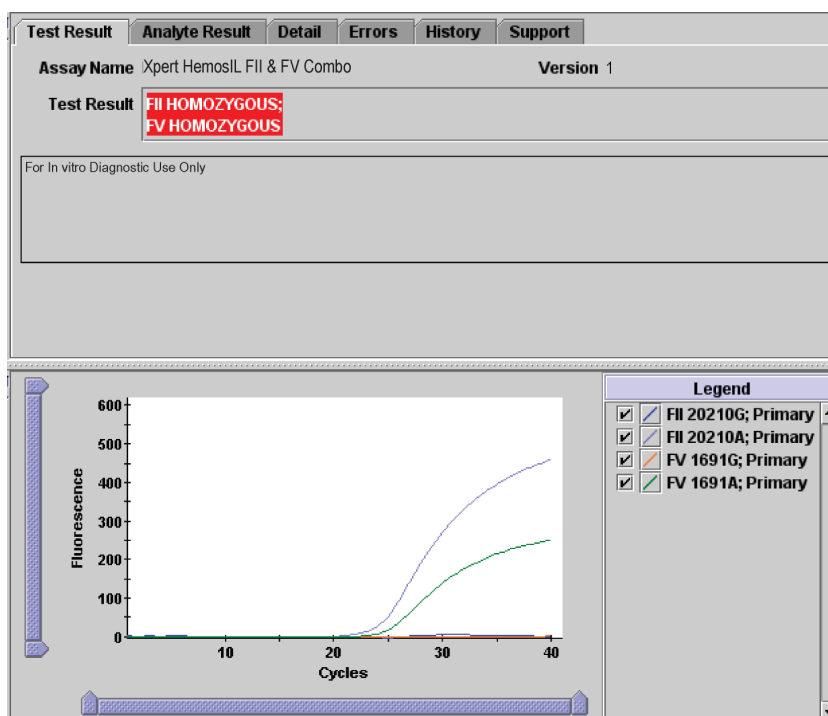


Figure 11. GeneXpert Dx System—View Results window, FII & FV homozygous result

INVALID

Presence or absence of Factor II/Factor V normal and mutant alleles cannot be determined; repeat assay according to instructions below. The sample was not properly processed or PCR was inhibited.

- INVALID—Presence or absence of Factor II/Factor V normal and mutant alleles cannot be determined.
- Probe Check—PASS; all probe check results pass.

ERROR

Presence or absence of Factor II/Factor V normal and mutant alleles cannot be determined; repeat assay according to instructions below. The Probe Check control failed and the assay aborted possibly due to an improperly filled reaction tube, or a probe integrity problem was detected. Errors may also be caused by exceeding the maximum pressure limits or a system component failure.

- ERROR
- Probe Check—FAIL*; one or more of the probe check results fail.

*If the probe check passed, the error is caused by a system component failure.

NO RESULT

Presence or absence of Factor II/Factor V normal and mutant alleles cannot be determined; repeat assay according to instructions below. Insufficient data were collected to produce an assay result (for example, this can occur if the operator stopped a test that was in progress).

- NO RESULT
- Probe Check—NA (not applicable)

Reasons to Repeat the Assay

Repeat the assay using a new cartridge (do not re-use the cartridge), new liquid reagents 1 and 2, and a new aliquot of sodium citrate or EDTA anticoagulated whole blood:

- An INVALID result indicates that the sample was not properly processed or PCR was inhibited.
- An ERROR result indicates that the Probe Check control failed and the assay was aborted possibly due to an improperly filled reaction tube, or a reagent probe integrity problem was detected. Errors may also be caused by exceeding the maximum pressure limits or a system component failure.
- A NO RESULT indicates that insufficient data were collected. For example, the operator stopped a test that was in progress.

Limitations

- The performance of the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay was validated using the procedures provided in this package insert only. Modifications to these procedures may alter the performance of the test. Results from the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay should be interpreted in conjunction with other laboratory and clinical data available to the clinician.
- Rare Factor V mutations (A1696G, G1689A, and A1692C) and any additional SNPs in the probe binding region may interfere with the target detection and yield an INVALID result.

Interfering Substances

Patients on heparin therapy and blood transfusion patients may have blood specimens that potentially interfere with the PCR results and lead to invalid or erroneous results.

Studies of potentially interfering substances showed no inhibition from up to 14.3 USP units/mL heparin, 16 mg/dL bilirubin, 250 mg/dL added cholesterol, or 1932 mg/dL total triglycerides (lipids). No inhibition was observed using whole blood samples which had gone through one freeze-thaw cycle (hemolyzed blood). No statistical significance was observed between matched specimens drawn into EDTA or sodium citrate.

Expected Values

Factor II (G20210A) and Factor V Leiden (G1691A) mutations are present in 2% and 5% of the general population, respectively⁷.

Performance Characteristics**Clinical Performance**

Performance characteristics of the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay were determined in a multi-site investigational study at seven institutions by comparing the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay with bi-directional sequencing.

Specimens included those whose routine care called for collection of whole blood for Factor II and/or Factor V testing. Samples were first tested by routine methods used in each participating laboratory and then aliquots collected for study testing by the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay on the GeneXpert. Excess DNA was sent to a contract laboratory for bi-directional sequencing.

Performance of the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay was calculated relative to bi-directional sequencing results.

Overall Results

Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay

A total of 1018 samples were tested for Factor II by both the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay and bi-directional sequencing. A total of 1014 samples were tested for Factor V by both the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay and bi-directional sequencing. To supplement the homozygous sample size, six human genomic DNA samples homozygous for Factor II and five homozygous for Factor V were also tested by the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay and bi-directional sequencing. The results are presented in Table 1.

The Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay demonstrated a 99.3% overall accuracy relative to bi-directional sequencing for both Factor II and Factor V.

Tableau 1. Xpert HemosIL Performance vs. Bi-directional Sequencing

Genotype	Number Tested	Number of Correct Calls on First Run	Number of Invalid ^a Calls on First Run	Agreement on First Run	Number of Correct Calls Including Repeat Run	Number of Invalid ^a Calls on Repeat Run	Agreement After Repeat Run
Factor II G20210A							
WT ^d	968	927	41	95.8%	963	5	99.5%
HET	50	48	2	96.0%	48	2	96.0%
HOM	7	7	0	100.0%	7	0	100%
Overall	1025 ^b	982	43	95.8%	1018	7	99.3%
Factor V G1691A							
WT	895	860	35	96.1%	889	6	99.3%
HET	114	108	6	94.7%	113	1	99.1%
HOM	12	11	1	91.7%	12	0	100.0%
Overall	1021 ^c	979	42	95.9%	1014	7	99.3%

^a No discordant results. Invalid results refer to "indeterminate" results.

^b Bi-directional sequencing results for Factor II were not available for 4 specimens.

^c Bi-directional sequencing results for Factor V were not available for 8 specimens.

^d WT (wildtype) is normal

Analytical Specificity

To evaluate the analytical specificity of the Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay, normal gene sequences containing silent single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the probe binding region as well as outside the probe binding region were synthesized. The presence of the additional SNP in the probe binding region, in most cases, resulted in an invalid result. When a valid result was obtained, it gave the correct genotype.

The presence of an additional SNP outside the probe binding region resulted in the correct genotyping call.

Analytical Sensitivity

Studies were performed to determine the minimum and maximum amount of input patient specimen for both EDTA and sodium citrate anticoagulated whole blood needed to obtain a correct genotype, such that the lower bound of the 95% confidence interval for the estimated "correct call" fraction is greater than 95%.

EDTA and sodium citrate anticoagulated blood samples were tested (n=20) at 8 volumes varying from 5 µL to 250 µL.

Although the assay can tolerate varying volumes from 15 µL – 100 µL, 50 µL is the recommended sample volume to minimize the risk of errors associated with limited and excess sample.

Reproducibility

A panel of 5 specimens, consisting of one of each specimen type listed below, was tested in duplicate by two different operators on 5 different days at each of three sites (3 specimens x 2 times/day x 2 operators per site x 5 days x 3 sites). One lot of Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay kit was used at each of the 3 testing sites. Xpert HemosIL Factor II & Factor V assays were performed according to the Xpert HemosIL Factor II & Factor V procedure. Results are summarized in Tables 2-5.

Study panel:

1. a sample with normal (wildtype) alleles for both Factor II & Factor V;
2. a sample heterozygous for Factor II mutation (i.e., one mutant and one wildtype allele for Factor II gene) and with normal (wildtype) alleles for Factor V;
3. a sample homozygous for Factor II mutation (i.e., two mutant alleles for Factor II gene) and with normal (wildtype) alleles for Factor V;
4. a sample with normal (wildtype) alleles for Factor II and homozygous for Factor V mutation (i.e., two mutant alleles for Factor V gene);
5. a sample with normal (wildtype) alleles for Factor II and heterozygous for Factor V mutation (i.e., one mutant and one wildtype allele for Factor V gene).

A summary of the results by site is shown in tables 2 and 3. There was no statistically significant difference in results among sites for either Factor II (p=1.000) or Factor V (p=1.000).

Tableau 2. Summary of Reproducibility Results by Site – Factor II

Specimen ID	Site 1	Site 2	Site 3	% Total Agreement by Sample
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total Agreement by Site	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a No discordant results. One sample was indeterminate after retest.

Tableau 3. Summary of Reproducibility Results by Site – Factor V

Specimen ID	Site 1	Site 2	Site 3	% Total Agreement by Sample
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total Agreement by Site	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a No discordant results. One sample was indeterminate after retest.

A summary of the results by operator is shown in tables 4 and 5. There was no statistically significant difference in results among sites for either Factor II (p=1.000) or Factor V (p=1.000).

Tableau 4. Summary of Reproducibility Results by Operator – Factor II

Specimen ID	Site 1		Site 2		Site 3		% Total Agreement by Sample
	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HET/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HOM/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total Agreement by Operator	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a No discordant results. One sample was indeterminate after retest.

Tableau 5. Summary of Reproducibility Results by Operator – Factor V

Specimen ID	Site 1		Site 2		Site 3		% Total Agreement by Sample
	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HET/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HOM/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total Agreement by Operator	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a No discordant results. One sample was indeterminate after retest.

To assess the between lot reproducibility, the 5-specimen panel described above was analyzed two times per day over 5 testing days using each of three assay lots at a single testing site (5 specimens x 2 runs per day x 3 lots x 5 days). A summary of the results by lot is shown in tables 6 and 7. There was no statistically significant difference in results between lots for either Factor II (p=1.000) or Factor V (p=1.000).

Tableau 6. Summary of Reproducibility Results by Lot – Factor II

Specimen ID	Lot 1	Lot 2	Lot 3	% Total Agreement by Sample
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Total Agreement by Lot	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Tableau 7. Summary of Reproducibility Results by Lot – Factor V

Specimen ID	Lot 1	Lot 2	Lot 3	% Total Agreement by Sample
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Total Agreement by Lot	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

References

1. Thrombophilia as a multigenic disease. B. Zoeller, P.G. de Frutos, A. Hillarp, B. Dahlback. *Haematologica* 1999; 84:59–70.
2. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. V. De Stefano, E. Rossi, K. Paciaroni, G. Leone. *Haematologica* 2002; 87:1095 – 1108.
3. Laboratory investigation of thrombophilia. A Tripodi and P.M. Mannucci. *Clinical Chemistry* 2001; 47:1597–1606.
4. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Elaine B. Spector, Wayne W. Grody, Carla J. Matteson, Glenn E. Palomaki, Daniel B. Bellissimo, Daynna J. Wolff, Linda A. Bradley, Thomas W. Prior, Gerald Feldman, Bradley W. Popovich, Michael S. Watson, and C. Sue Richards. *ACMG Standards and Guidelines* July/August 2005, Vol. 7, No. 6.
5. Centers of Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, *et al.* American college of medical genetic consensus statement on factor V leiden mutation testing. *Genetics in Medicine*. 2001; 3(2):139–148.

Table of Symbols

Tableau 8. Symbol Meaning

Symbol	Meaning
	Catalog number
	<i>In vitro</i> diagnostic medical device
	Do not re-use
	Caution, consult accompanying document
	Manufacturer
	Contains sufficient for <n> tests
	Control
	CE marking – European Conformity
	Authorized representative in the European Community
	Temperature limitation
	Biological hazard

Manufacturer

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Phone: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

Authorized Representative

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01

Distributed exclusively by

 **Instrumentation Laboratory**



Français

Dispositif médical à usage Diagnostique *In Vitro*

Marque

Xpert® HemosIL® FII & FV

Désignation commerciale

Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay

Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Utilisation

Le réactif Xpert HemosIL FII & FV est un test qualitatif de typage génétique à usage diagnostique *in-vitro*. Il est utilisé pour la détection des allèles des Facteurs II et V sur sang total prélevé sur citrate de sodium ou EDTA. Le test est réalisé sur les instruments Cepheid GeneXpert® Dx. Ce test est utilisé pour la détermination des mutations des facteurs II (G20210A) et V Leiden (G1691A) comme aide au diagnostic chez les patients suspectés de thrombophilie.

Description

L'association des mutations des Facteurs II (G20210A) et V Leiden (G1691A) à un risque accru de thrombose veineuse est parfaitement documentée^{1, 2, 3, 4}. La mutation du Facteur II ou Prothrombine (G20210A) se traduit par le changement de G en A sur le nucléotide 20210 dans la région 3' non traduite du gène et est associée à une élévation du taux plasmatique de prothrombine. La mutation du Facteur V Leiden (G1691A) se traduit par le changement de G en A sur le nucléotide en position 1691 du gène du Facteur V, résultant en une substitution de l'acide aminé Arginine par la Glutamine dans la protéine Facteur V, entraînant une résistance au clivage par la Protéine C Activée (PCA).

Les mutations des facteurs II (G20210A) et V Leiden (G1691A) sont présentes dans 2% et 5% de la population générale, respectivement⁷.

Principe du test

Le système GeneXpert Dx automatise et intègre l'extraction des acides nucléiques, leur amplification et la détection de la séquence cible, dans des échantillons de sang total, en utilisant la PCR en temps réel. Le système consiste en un instrument, un lecteur code barres externe et un ordinateur équipé d'un logiciel spécifique permettant d'exécuter le test et de visualiser les résultats. Le système utilise des cartouches à usage unique qui contiennent les réactifs nécessaires à la PCR et permettent via l'ordinateur de commande de réaliser le processus complet de PCR. Le procédé de ces cartouches à usage unique permet d'éviter toute contamination entre échantillons. Pour une description complète du système se référer au *manuel d'utilisation du système GeneXpert Dx*.

Le dispositif Xpert HemosIL Factor II & Factor V contient les réactifs nécessaires à la détection des allèles normaux ou mutants des Facteurs II et V à partir de sang total prélevé sur citrate de sodium ou EDTA. Chaque cartouche contient un contrôle de sondes (Probe Check Control, PCC) permettant de vérifier la réhydratation des réactifs, le remplissage de la cartouche, l'intégrité des sondes et la stabilité des colorants.

Les amorces et les sondes contenus dans la cartouche Xpert HemosIL Factor II & Factor V permettent la caractérisation génotypique du gène du Facteur II (en position 20210) et/ou du gène du Facteur V (en position 1691).

Réactifs et Instruments



Matériel fourni

Le coffret Xpert HemosIL Factor II & Factor V contient les réactifs nécessaires à l'analyse de 10 échantillons de patients ou de contrôle de qualité. Le coffret contient le matériel suivant :

- 10 cartouches Xpert HemosIL Factor II & Factor V avec 10 tubes de réaction intégrés
- Particule 1 (congelée - sec) 1 par cartouche
 - Polymérase
 - dNTPs
 - Albumine Sérique Bovine (BSA)
- Particule 2 (congelée - sec) 1 par cartouche
 - Amorces
 - Sondes
 - BSA
- Réactif 1 (Tampon Tris, EDTA, Tween-20) (TET) 3,0 mL par cartouche
- Réactif 2 (Tampon Tris, GHCl, Sarkosyl, Tween-20) (GHCl) 3,0 mL par cartouche
- CD
 - Fichier de paramétrage (ADF)
 - Instructions d'importation du fichier ADF dans le logiciel GX
 - Notice

Stockage et manipulation



- Stocker les cartouches Xpert HemosIL FII & FV et les réactifs entre 2 °C et 28 °C.
- Ne pas utiliser les cartouches au delà de la date de péremption.
- Ne pas ouvrir la cartouche avant d'être en mesure de réaliser le test.
- Utiliser la cartouche dans les 30 minutes suivant l'ouverture du couvercle.



Matériels nécessaires mais non fournis

- Système GeneXpert Dx (Référence variable en fonction de la configuration): instrument GeneXpert, ordinateur, lecteur code barres et *manuel d'utilisation système GeneXpert Dx*.

Note: La référence du système GeneXpert Dx varie en fonction de la configuration. Contacter Cepheid ou le distributeur I.L. pour plus d'informations.

- Logiciel GeneXpert version 4.0 et supérieure.
- Pipette permettant de distribuer 50 µL de sang total Citrate de sodium ou EDTA avec embout muni d'un filtre résistant aux aérosols.
- HemosIL FII & FV DNA Control, Réf 0020003500.

Précautions



- Nocif en cas d'ingestion (R22), irritant pour les yeux et la peau (R36/38)
- Manipuler les échantillons biologiques, y compris les cartouches, comme s'ils étaient potentiellement infectieux. Comme il est impossible de déterminer avec certitude qu'un échantillon biologique est indemne de toute contamination, manipuler les échantillons avec les précautions d'usage. Se référer aux recommandations pour la manipulation des échantillons disponible auprès des U.S. Centers for Disease Control and Prevention⁵ and the Clinical et du Laboratory Standards Institute (anciennement National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁶
- Se conformer aux instructions de sécurité en vigueur dans votre laboratoire pour manipuler les produits chimiques et les échantillons biologiques.
- Utiliser les cartouches avant la date de péremption indiquée sur le coffret.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche Xpert HemosIL Factor II & Factor V excepté lors de l'ajout de l'échantillon.
- Ne pas utiliser une cartouche étant tombée ou ayant été agitée violemment après l'ajout de l'échantillon.

- ② • Chaque cartouche à usage unique Xpert HemosIL Factor II & Factor V est prévue pour la réalisation d'un test. Ne pas réutiliser une cartouche ayant servi.
- Eliminer les cartouches Xpert HemosIL Factor II & Factor V usagées ainsi que les réactifs non utilisés conformément aux directives de sécurité de votre établissement. Les caractéristiques de risques de ces matériels peuvent correspondre aux recommandations de « federal EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) », faisant appel à des procédures spécifiques d'élimination. Vérifier les procédures d'élimination en vigueur localement et pouvant différer de celles en vigueur aux USA. Il est recommandé aux établissements situés hors des USA de vérifier les procédures d'élimination des déchets en vigueur localement.
- 12/28 °C • Stocker le coffret Xpert HemosIL Factor II & Factor V à 2–28 °C.
- Ne pas ouvrir le couvercle de la cartouche avant d'être en mesure de réaliser le test.
- Si durant les différentes étapes, la pression interne de la cartouche se trouve à un niveau supérieur à celui défini par le fabricant, le test en cours est automatiquement arrêté et une ERREUR est indiquée en lieu et place du résultat.
- Les fiches techniques de données de sécurité (Material Safety Data Sheets, MSDS) de tous les réactifs fournis dans ce test sont disponibles auprès de l'Assistance technique de Cepheid et sur les sites Web de Cepheid, www.cepheid.com et www.cepheidinternational.com.
- L'Albumine Sérique Bovine (BSA) utilisée dans ce réactif a été produite sur le territoire des Etats-Unis d'Amérique à partir de plasmas bovins exclusivement d'origine USA. Aucune protéine de ruminant ou d'autre origine animale n'a fait partie de l'alimentation des animaux source de la BSA. Ces derniers ont fait l'objet de tests ante et post mortem. Durant le procédé de fabrication, tout contact avec d'autres produits d'origine animale a été soigneusement évité.

Recueil et transport des spécimens



Pour obtenir un spécimen de patient conforme, suivre les instructions ci-dessous.

1. Seuls les personnels formés et agréés sont habilités à prélever du sang sur tubes contenant de l'EDTA ou du citrate trisodique.
2. Ne pas centrifuger ou concentrer l'échantillon de sang par élimination du plasma.
3. Le sang doit être traité dans les 24 heures suivant le prélèvement quand il est conservé à température ambiante (22–28 °C). Les échantillons peuvent être conservés à 2–8 °C si le stockage excède les 24 heures. Dans ces conditions, l'échantillon est stable jusqu'à 15 jours. Les échantillons de sang peuvent être également conservés jusqu'à 3 mois à -20 °C ou -80 °C. Utiliser un congélateur adapté.

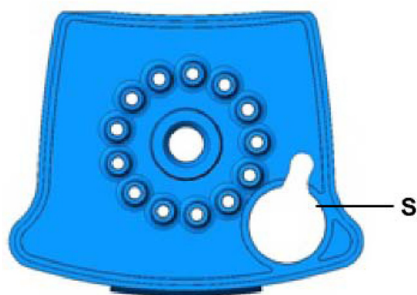
Tous les échantillons doivent être entièrement décongeler à température ambiante. Eviter de congeler / décongeler les échantillons plus de 2 fois.

4. Mélanger l'échantillon 5 fois par inversion avant distribution dans la cartouche.

Procédure

Préparation de la cartouche

Important: Commencer l'analyse dans les 15 minutes suivant l'ajout de l'échantillon dans la cartouche.



S = Echantillon

Figure 1. Cartouche Xpert HemosIL FII & FV (vue de dessus)

Pour ajouter l'échantillon dans la cartouche :

1. Sortir la cartouche du coffret.
2. Il n'est pas nécessaire d'équilibrer la cartouche à température ambiante avant utilisation.
3. Mélanger l'échantillon en procédant à plusieurs inversions jusqu'à complète homogénéisation.
4. Ouvrir le couvercle de la cartouche. A l'aide d'une pipette munie d'un filtre résistant aux aérosols, transférer 50 µL d'échantillon de sang total citrate de sodium ou EDTA le long de la paroi de l'ouverture « S » de la cartouche Xpert HemosIL Factor II & Factor V.
5. Refermer le couvercle de la cartouche.

Commencer l'analyse

Important: Avant de commencer l'analyse s'assurer que le paramétrage des tests Xpert HemosIL FII, Xpert HemosIL FV et Xpert HemosIL FII & FV Combo a été importé dans le logiciel de l'analyseur. Le paramétrage se trouve sur le CD fourni avec le coffret.

Ci-après, sont données les instructions de base pour réaliser le test. Pour plus d'informations se référer au *manuel d'emploi du système GeneXpert Dx*.

1. Mettre sous tension l'instrument GeneXpert Dx, puis l'ordinateur ; le logiciel GeneXpert démarrera automatiquement.
2. Saisir votre nom utilisateur et votre mot de passe dans le logiciel du GeneXpert Dx.
3. Dans la fenêtre du système GeneXpert Dx, cliquer sur « Créer Test ». La fenêtre « Créer Test » apparaît.
4. Lire le code barres de la cartouche avec le lecteur.
5. Dans la fenêtre ID échantillon, entrer l'ID échantillon ou la lire à l'aide du lecteur code barres. S'assurer que l'ID échantillon est correcte, dans le cas d'une saisie manuelle. L'ID échantillon est associée aux résultats du test et apparaît dans la fenêtre « Visualiser Résultats » et sur tous les rapports.

Create Test

Sample ID* MT01800

Name	Version
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FV	1
Xpert HemosIL FII & FV Combo	1

Reagent Lot ID* Xpert HemosIL FII & FV Combo

Test Type Specimen

Sample Type Other Other Sample Type

Notes

Start Test Scan Cartridge Barcode Cancel

Figure 2. Fenêtre sélection d'un test

6. A partir du menu de sélection des tests, sélectionner le test approprié.
7. Cliquer sur Démarrer Test. Dans la boîte de dialogue qui apparaît, saisir votre mot de passe.
8. Ouvrir la porte du module de l'instrument, lorsque le voyant vert clignote, charger la cartouche.
9. Refermer la porte. Le test démarre, et le voyant vert cesse de clignoter. Lorsque l'analyse est terminée, le voyant s'éteint.
10. Lorsque le système déverrouille la porte, l'ouvrir et retirer la cartouche usagée.
11. Jeter la cartouche usagée dans un conteneur approprié, en concordance avec les pratiques de votre laboratoire.

Visualiser et imprimer les résultats

Pour de plus amples informations relatives à ces fonctions, se référer au *manuel d'utilisation du système GeneXpert Dx*.

CONTROL Contrôle de Qualité

Chaque test intègre un contrôle de sondes (PCC).

Contrôle de Sondes (PCC)—Avant que la réaction de PCR ne commence, le système GeneXpert Dx mesure le signal de fluorescence des sondes afin de contrôler la réhydratation des particules, le remplissage du tube réactionnel, l'intégrité des sondes et la stabilité des colorants. Les résultats du contrôle de sondes sont acceptés si ceux-ci se trouvent dans les limites d'acceptabilité.

Contrôles externes de qualité - HemosIL FII & FV DNA Control Réf 0020003500 a été conçu et validé pour être utilisé comme contrôle externe de qualité pour le test Xpert HemosIL FII & FV.

De façon alternative, des échantillons de sang total (citrate de sodium ou EDTA) issus de patients normaux, hétérozygotes ou homozygotes pour le facteur II/facteur V peuvent également être utilisés à des fins de formation, d'évaluation de compétence et de contrôle qualité externe dans le cadre de l'utilisation du test Xpert HemosIL Factor II & Factor V.

Interprétation des Résultats

Les résultats sont interpolés par le système GeneXpert Dx à partir des signaux de fluorescence mesurés puis interprétés à l'aide d'algorithmes afin d'identifier les génotypes et enfin affichés dans la fenêtre « Visualiser résultats ».

Pour les résultats Xpert HemosIL FII (figures 3 à 5)

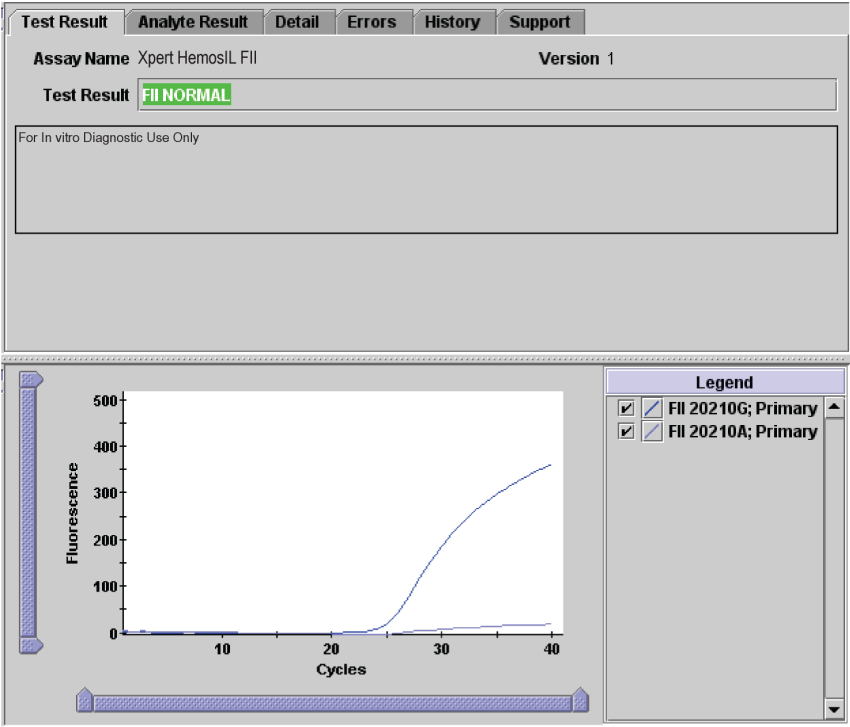


Figure 3. Système GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat normal FII

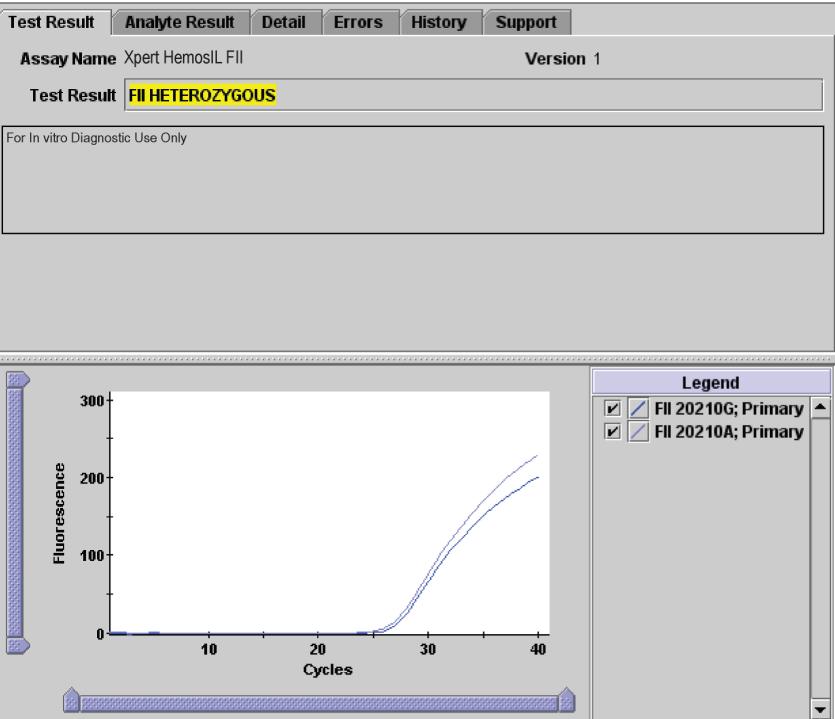


Figure 4. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat hétérozygote FII

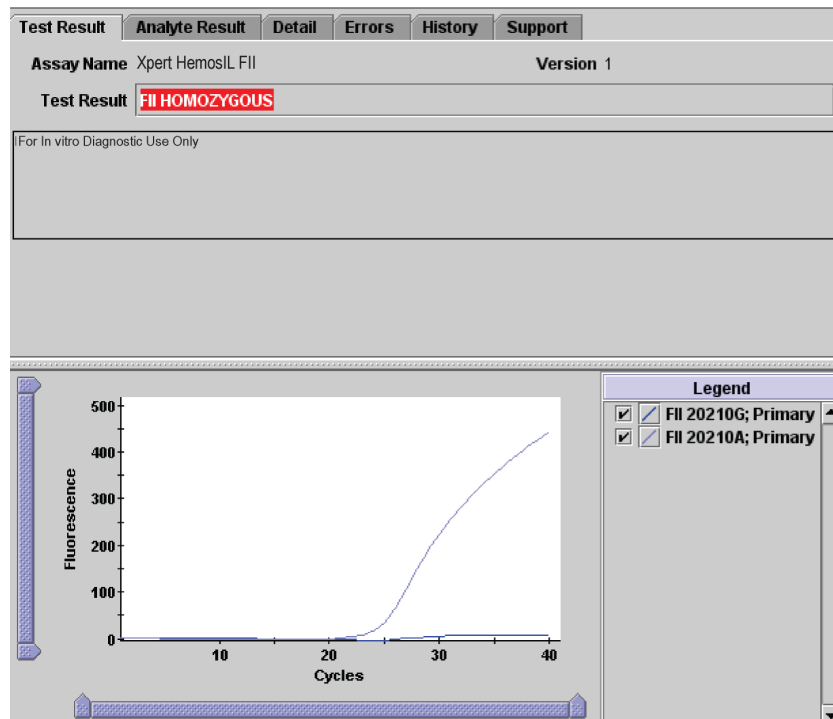


Figure 5. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat homozygote FII

Pour les résultats Xpert HemosIL FV (figures 6 à 8)

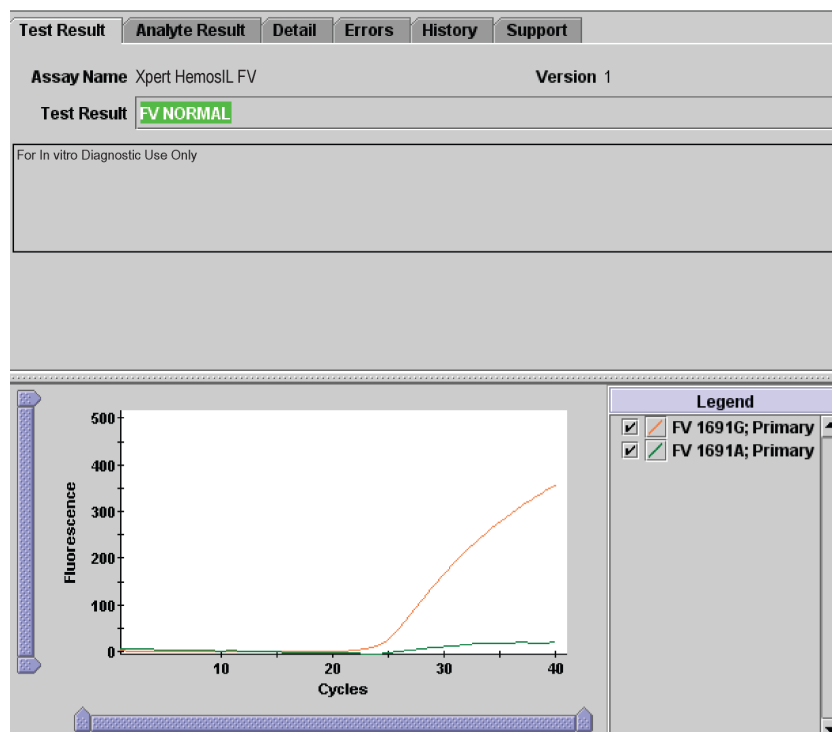


Figure 6. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat normal FV

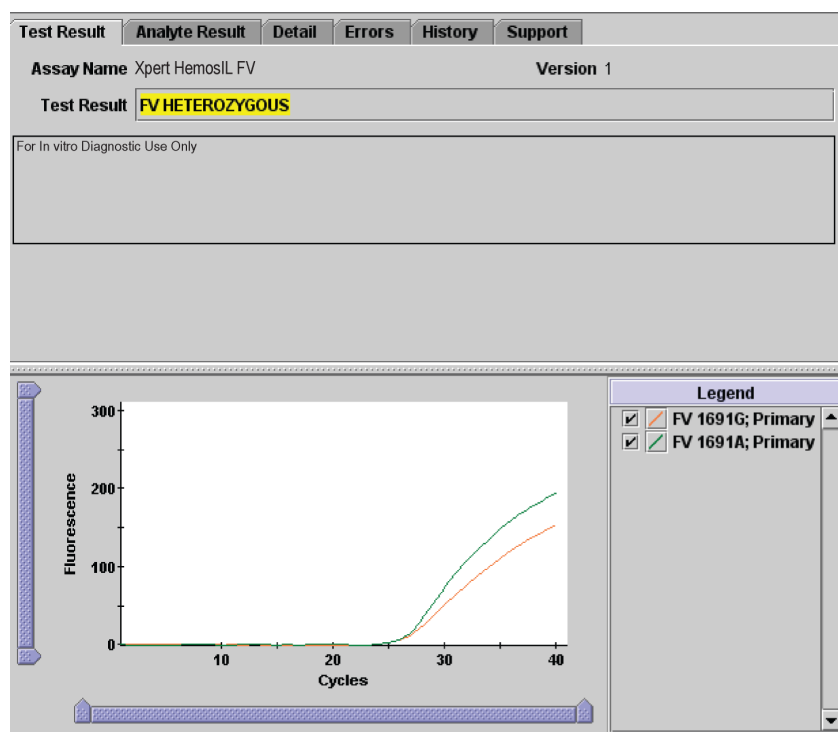


Figure 7. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat hétérozygote FV

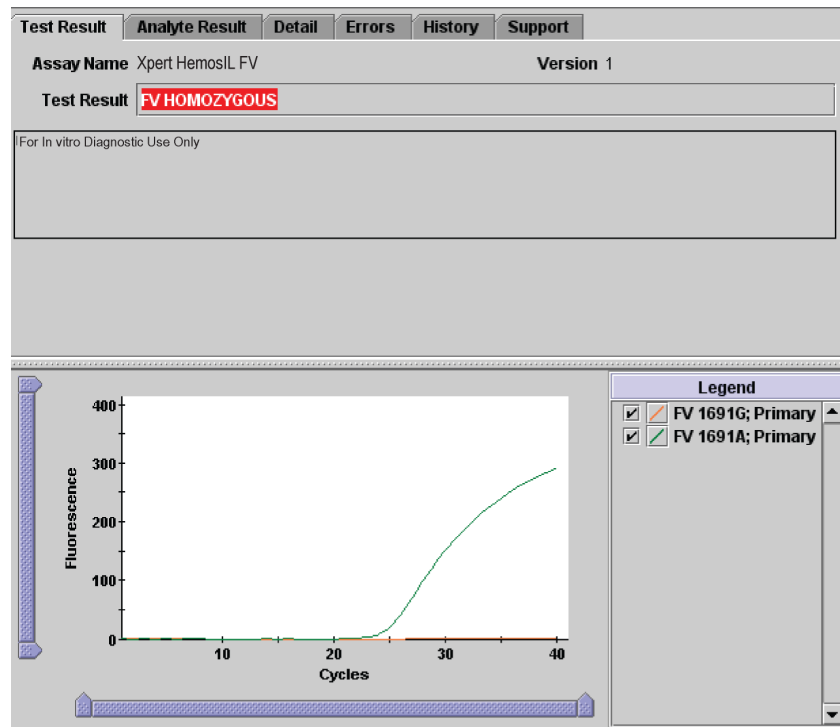


Figure 8. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat homozygote FV

Pour les résultats Xpert HemosIL FII & FV Combo (figures 9 à 11)

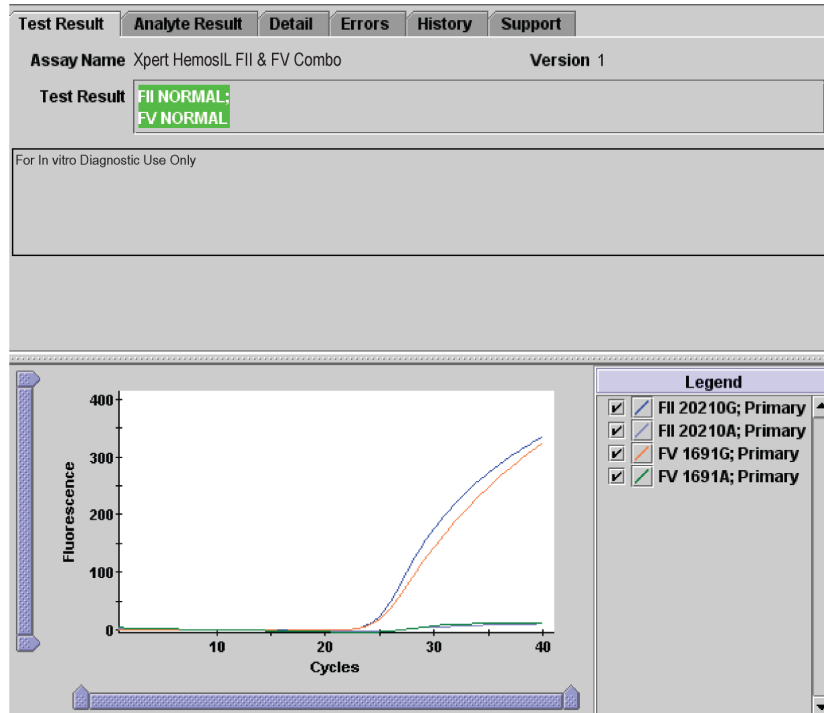


Figure 9. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat normal FII & FV

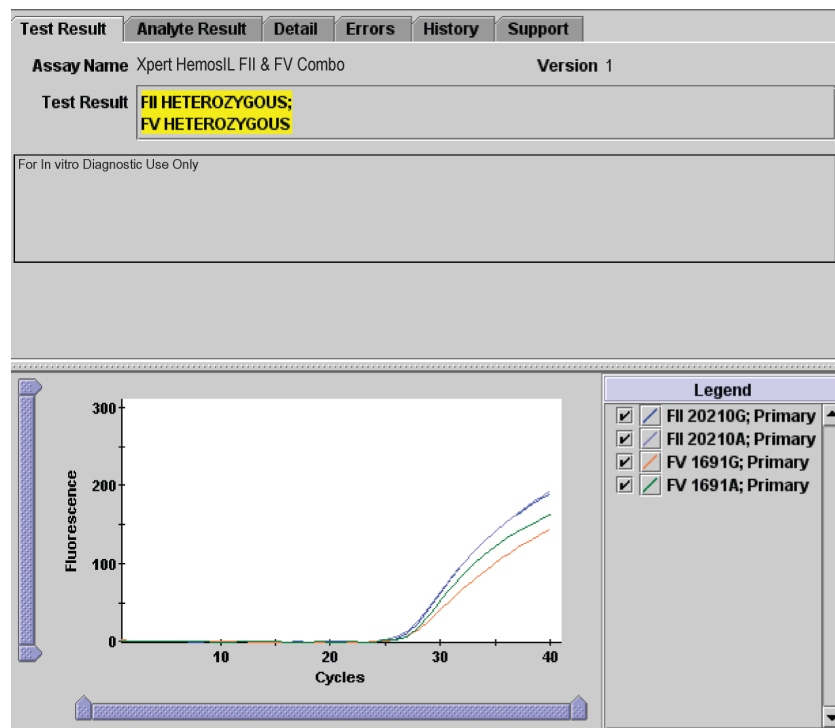


Figure 10. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat hétérozygote FII & FV

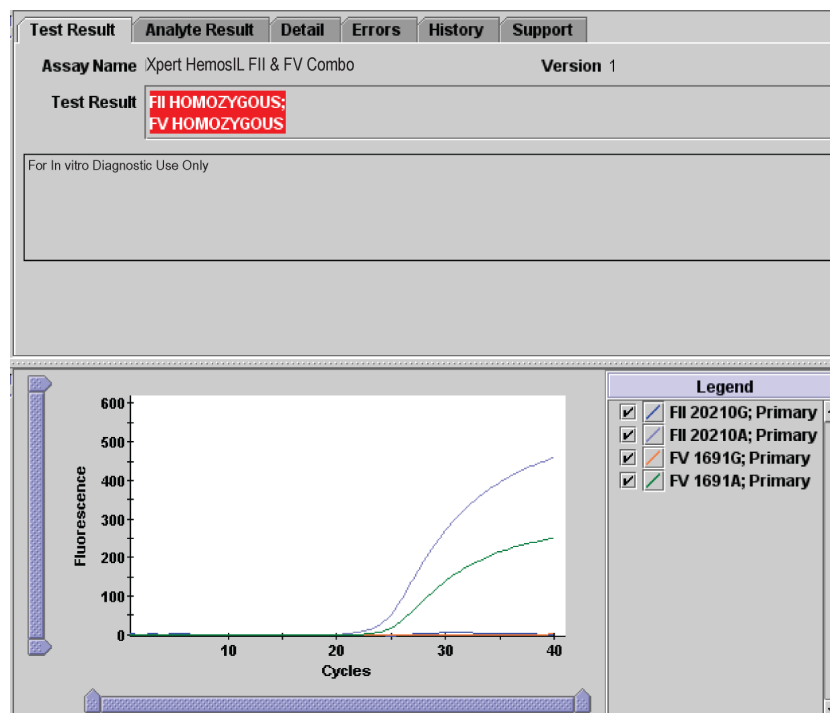


Figure 11. GeneXpert Dx—Fenêtre « Visualiser résultats », résultat homozygote FII & FV

INVALIDES

Si la présence ou l'absence d'allèles normaux ou mutés Facteur II/Facteur V ne peut être déterminée, réitérer le test selon les instructions ci-dessous. L'échantillon n'a pas été traité dans des conditions optimales ou la réaction de PCR est inhibée.

- **INVALIDE**— La présence ou l'absence d'allèles normaux ou mutés Facteur II/Facteur V ne peut être déterminée.
- **Contrôle Sondes**—**ACCEPTES**; Tous les résultats du contrôle de sondes sont validés.

ERREUR

Si la présence ou l'absence d'allèles normaux ou mutés Facteur II/Facteur V ne peut être déterminée, réitérer le test selon les instructions ci-dessous. Le contrôle de sondes est en échec. Ce dernier peut être dû à un remplissage incorrect du tube réactionnel, à un défaut d'intégrité de sonde. Cela peut être également dû au dépassement de la pression limite dans la cartouche ou à un défaut d'un des composants du système.

- **ERREUR**
- **Contrôle Sondes**—**ECHEC***; un ou plusieurs résultat(s) du contrôle de sondes est ou sont en échec.

* si le contrôle de sondes est accepté alors l'erreur est liée à un autre composant du système.

AUCUN RESULTAT

Si la présence ou l'absence d'allèles normaux ou mutés Facteur II/Facteur V ne peut être déterminée, réitérer le test selon les instructions ci-dessous. Un nombre insuffisant de données a été collecté pour que le système soit en mesure de donner un résultat (par exemple, l'utilisateur a arrêté un test en cours d'exécution).

- **AUCUN RESULTAT**
- **Contrôle de Sondes** — **NA** (non applicable)

Causes de répétition d'un test

Répéter le test avec une nouvelle cartouche (ne pas réutiliser la cartouche précédemment utilisée), de nouveaux réactifs liquides 1 & 2 et un nouvel échantillon de sang total citrate de sodium ou EDTA :

- **INVALIDE** : un résultat invalide est l'indication que l'échantillon n'a pas été traité dans des conditions optimales ou que la réaction de PCR est inhibée.
- **ERREUR** : un résultat en erreur est l'indication que le Contrôle de Sondes est en échec et que le test a été interrompu par le système. Ceci peut être dû à un remplissage incorrect du tube réactionnel ou à un défaut d'intégrité de sonde(s). L'erreur peut être également liée à un dépassement de la pression limite ou à un défaut de l'un des composants du système.
- **AUCUN RESULTAT** : l'absence de résultat est l'indication qu'un nombre insuffisant de données a été collecté. Par exemple, l'utilisateur a arrêté un test en cours d'exécution.

Limitations

- Les performances du test Xpert HemosIL Factor II & Factor V ont été validées en utilisant la procédure décrite dans la notice du coffret uniquement. Toute modification de cette procédure peut entraîner une altération des performances du test. Les résultats du test Xpert HemosIL Factor II & Factor V doivent être interprétés en conjonction avec les autres données du laboratoire et les données cliniques disponibles.
- De rares mutations du facteur V (A1696G, G1689A et A1692C) ou tout autre SNP peuvent apparaître dans la zone d'appariement de la sonde pouvant entraîner une interférence avec la détection de la cible. Ce phénomène donnera lieu à un résultat INVALIDE.

Limites de la méthode et substances interférant avec celle-ci

Les échantillons issus de patients sous traitement à l'héparine ou transfusés peuvent potentiellement donner lieu à des interférences avec la réaction de PCR et entraîner l'obtention de résultats invalides ou erronés.

Une étude portant sur les interférences potentielles a montré qu'aucune interférence n'est détectée avec l'héparine jusqu'à 14,3 unités USP/ml, la bilirubine jusqu'à 16 mg/dl (160 mg/l), le cholestérol (surcharge) jusqu'à 250 mg/dl (2,5 g/l), les triglycérides totaux (équivalent lipides) jusqu'à 1932 mg/l (19,3 g/l). Aucune inhibition n'est observée avec des échantillons de sang total ayant subi une congélation/décongélation (hémolyse). Aucune différence statistiquement significative n'est observée entre les résultats obtenus avec des échantillons de sang prélevé sur EDTA et ceux obtenus avec des échantillons de sang prélevé sur citrate de sodium.

Valeurs attendues

Les mutations des Facteurs II (G20210A) et V Leiden (G1691A) sont présentes dans 2% et 5% de la population générale respectivement⁷.

Caractéristiques et performances

Performances Cliniques

Les performances du test Xpert HemosIL Factor II & Factor V ont été évaluées au cours d'une étude prospective multi-centrique dans 7 sites. Les résultats du test Xpert HemosIL Factor II & Factor V ont été comparés à ceux obtenus avec la méthode de séquençage bi-directionnel.

Les échantillons de patients consécutifs inclus dans cette étude, échantillons de sang total prélevés à des fins de détermination en routine des Facteurs II/V, ont été analysés en premier lieu en utilisant la méthode de routine dans chaque centre participant. Ces échantillons ont été ensuite aliquotés et collectés pour être analysés avec le réactif Xpert HemosIL Factor II & Factor V sur le GeneXpert. L'excès d'ADN a été transmis à un laboratoire sous contrat afin d'être testé en séquençage bi-directionnel.

Les performances du réactif Xpert HemosIL Factor II & Factor V ont été analysées en comparaison des résultats obtenus en séquençage bi-directionnel.

Résultats

Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Un total de 1018 échantillons de patients, pour la détermination du Facteur II, a été analysé en utilisant le réactif Xpert HemosIL Factor II & Factor V et la méthode de séquençage bi-directionnel. Un total de 1014 échantillons de patients, pour la détermination du Facteur V, a été analysé en utilisant le réactif Xpert HemosIL Factor II & Factor V et la méthode de séquençage bi-directionnel. Afin d'augmenter la taille de l'échantillonnage des homozygotes, six échantillons d'ADN génomique humain homozygote pour le Facteur II et 5 homozygotes pour le Facteur V ont été analysés en utilisant le réactif Xpert HemosIL Factor II & Factor V et la méthode de séquençage bi-directionnel. Les résultats sont présentés dans le tableau 1

Le test Xpert HemosIL Factor II & Factor V montre une exactitude relative totale de 99.3% avec la méthode de séquençage bi-directionnel pour le Facteur II et le Facteur V.

Tableau 1. Performances Xpert HemosIL vs. Séquençage Bi-directionnel

Génotype	Nombre d'échantillons testés	Nombre d'échantillons corrects lors de la première série d'analyses	Nombre d'invalides ^a lors de la première série d'analyses	Agrément à l'issue de la première série d'analyses	Nombre d'échantillons corrects incluant les réanalyses	Nombre d'invalides ^a incluant les réanalyses	Agrément incluant les réanalyses
Facteur II G20210A							
Sauvage^d	968	927	41	95.8%	963	5	99.5%
HET	50	48	2	96.0%	48	2	96.0%
HOM	7	7	0	100.0%	7	0	100%
Overall	1025 ^b	982	43	95.8%	1018	7	99.3%
Facteur V G1691A							
Sauvage	895	860	35	96.1%	889	6	99.3%
HET	114	108	6	94.7%	113	1	99.1%
HOM	12	11	1	91.7%	12	0	100.0%
Overall	1021 ^c	979	42	95.9%	1014	7	99.3%

^aAucun résultat discordant. Les résultats invalides se réfèrent à des résultats "indéterminés".

^bLes résultats du séquençage bi-directionnel pour le facteur II n'étaient pas disponibles pour 4 échantillons.

^cLes résultats du séquençage bi-directionnel pour le facteur V n'étaient pas disponibles pour 8 échantillons.

^dLe génotype Sauvage est normal.

Spécificité analytique

Afin de déterminer la spécificité analytique du test Xpert HemosIL Factor II & Factor V, des séquences de gène normal, contenant des « silent single nucleotide polymorphisms » (SNPs) dans la région d'appariement de la sonde ou à l'extérieur de cette zone, ont été synthétisées. La présence de SNP dans la région d'appariement de la sonde a donné lieu dans la majorité des cas à l'obtention d'un résultat invalide. Quand le résultat était valide, il correspondait au génotype correct.

La présence de SNP à l'extérieur de la zone d'appariement de la sonde a toujours correspondu à l'obtention du génotype correct.

Sensibilité analytique

Des études ont été réalisées afin de déterminer les quantités minimum et maximum de sang total citrate de sodium ou EDTA nécessaires pour obtenir un génotypage correct. Pour ce faire, la limite basse de l'intervalle de confiance 95% doit être supérieure à 95% pour une fraction estimée correcte.

Des échantillons de sang total citrate de sodium ou EDTA ont été testés en utilisant 8 volumes de prélèvement différents, variant de 5 à 250 µl.

Bien que le test puisse tolérer une variation du volume entre 15 et 100 µl, 50 µl est le volume d'échantillon recommandé afin de minimiser les risques d'erreurs liés à des quantités d'échantillons limitées ou en excès.

Reproductibilité

Un panel de 5 échantillons, un échantillon de chacun de ceux décrits plus bas, a été testé en duplicate par deux utilisateurs différents durant 5 jours dans 3 sites (3 échantillons x 2 fois/jour x 2 utilisateurs par site x 5 jours x 3 sites). Un lot de réactif Xpert HemosIL Factor II & Factor V a été utilisé sur les 3 sites. Les tests Xpert HemosIL Factor II & Factor V ont été réalisés conformément à la procédure de la notice du réactif Xpert HemosIL Factor II & Factor V. Les résultats sont présentés dans les tableaux 2 à 5.

Panel échantillons :

1. Un échantillon avec des allèles normaux (type sauvage) pour les Facteurs II & V.
2. Un échantillon hétérozygote pour la mutation du Facteur II (i.e. un allèle mutant & un allèle sauvage pour le gène du Facteur II) et normal pour les allèles du Facteur V (type sauvage).
3. Un échantillon homozygote pour la mutation du Facteur II (i.e. deux allèles mutants pour le gène du Facteur II) et normal pour les allèles du Facteur V (type sauvage).
4. Un échantillon normal pour les allèles du Facteur II (type sauvage) et homozygote pour la mutation du Facteur V (i.e. deux allèles mutants pour le gène du Facteur V).
5. Un échantillon normal pour les allèles du Facteur II (type sauvage) et hétérozygote pour la mutation du Facteur V (i.e. un allèle mutant & un allèle sauvage pour le gène du Facteur V).

Les résultats par site sont présentés dans les tableaux 2 & 3. Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre les résultats des différents sites pour le Facteur II ($p = 1.000$) ou le Facteur V ($p = 1.000$).

Table 2. Résultats de reproductibilité par Site – Facteur II

ID échantillon	Site 1	Site 2	Site 3	% Total d'Agrément par échantillon
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur II HET/ Facteur V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur II HOM/ Facteur V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur II NOR/ Facteur V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur II NOR/ Facteur V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total d'agrément par site	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^aAucun résultat discordant. Un échantillon était indéterminé après réanalyse.

Tableau 3. Résultats de reproductibilité par Site – Facteur V

ID échantillon	Site 1	Site 2	Site 3	% Total d'Agrément par échantillon
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur II HET/ Facteur V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur HOM/ Facteur V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur NOR/ Facteur V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Facteur II NOR/ Facteur V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total d'agrément par site	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^aAucun résultat discordant. Un échantillon était indéterminé après réanalyse.

Les résultats par utilisateur sont présentés dans les tableaux 4 & 5. Aucune différence statistiquement significative n'est trouvée entre sites pour les résultats des Facteur II (p=1.000) et Facteur V (p=1.000).

Tableau 4. Résultats de reproductibilité par utilisateur – Facteur II

ID échantillon	Site 1		Site 2		Site 3		% Total d'Agrément par échantillon
	Util. 1	Util. 2	Util. 1	Util. 2	Util. 1	Util. 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II HET/ Facteur V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II HOM/ Facteur V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II NOR/ Facteur V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II NOR/ Facteur V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total d'agrément par utilisateur	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^aAucun résultat discordant. Un échantillon était indéterminé après réanalyse

Tableau 5. Résultats de reproductibilité par utilisateur – Facteur V

ID échantillon	Site 1		Site 2		Site 3		% Total d'Agrément par échantillon
	Util. 1	Util. 2	Util. 1	Util. 2	Util. 1	Util. 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II HET/ Facteur V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II HOM/ Facteur V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II NOR/ Facteur V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Facteur II NOR/ Facteur V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Total d'agrément par utilisateur	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^aAucun résultat discordant. Un échantillon était indéterminé après réanalyse.

Afin de déterminer la reproductibilité entre lots, les 5 échantillons du panel décrit plus haut ont été analysés 2 fois par jour durant 5 jours en utilisant chacun des 3 lots sur un seul site (5 échantillons x 2 séries par jour x 3 lots x 5 jours). Les résultats par lot sont présentés dans les tableaux 6 & 7. Aucune différence statistiquement significative n'a été trouvée entre lots pour les résultats des Facteur II ($p=1.000$) et Facteur V ($p=1.000$).

Tableau 6. Résultats de reproductibilité par Lot – Facteur II

ID échantillon	Lot 1	Lot 2	Lot 3	% Total d'Agrément par échantillon
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II HET/ Facteur NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II HOM/ Facteur V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II NOR/ Facteur V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II NOR/ Facteur V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Total d'agrément par lot	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Tableau 7. Résultats de reproductibilité par Lot – Facteur V

ID échantillon	Lot 1	Lot 2	Lot 3	% Total d'Agrément par échantillon
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II HET/ Facteur V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II HOM/ Facteur V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II NOR/ Facteur V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Facteur II NOR/ Facteur V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Total d'agrément par lot	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Références

1. Thrombophilia as a multigenic disease. B. Zoeller, P.G. de Frutos, A. Hillarp., B. Dahlback. Haematologica 1999; 84:59-70.
2. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. V. De Stefano, E. Rossi, K. Paciaroni, G. Leone. Haematologica 2002; 87:1095 – 1108.
3. Laboratory investigation of thrombophilia. A Tripodi and P.M. Mannucci. Clinical Chemistry 2001; 47:1597 – 1606
4. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Elaine B. Spector, Wayne W. Grody, Carla J. Matteson, , Glenn E. Palomaki, Daniel B. Bellissimo,, Daynna J. Wolff, Linda A. Bradley, , Thomas W. Prior, Gerald Feldman, Bradley W. Popovich, Michael S. Watson, and C. Sue Richards ACMG Standards and Guidelines July/August 2005, Vol. 7, No. 6.
5. Centers of Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, et al. American college of medical genetic consensus statement on factor V leiden mutation testing. Genetics in Medicine. 2001;3(2):139-148.

Tableau des Symboles

Tableau 8. Signification des symboles

Symbol	Signification
	Numéro de référence
	Dispositif médical de diagnostic <i>in vitro</i>
	Ne pas réutiliser
	Attention, consulter les documents joints
	Fabricant
	Contient le nécessaire pour <n> tests
	Contrôle
	Marquage CE – Conformité européenne
	Mandataire établi dans la Communauté européenne
	Température dirigée
	Risque Biologique

Manufacturer

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Phone: +1.408.541.4191

Fax: +1.408.541.4192

Authorized Representative

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00

Fax: +33.563.82.53.01

Distributed exclusively by

 **Instrumentation Laboratory**



Deutsch

In Vitro Diagnostikum

Markenname

Xpert® HemosIL® FII & FV

Gebräuchlicher Name

Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit

Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V

Verwendung

Der Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit ist ein qualitativer in vitro diagnostischer Genotypisierungstest für die Erfassung von Faktor II und Faktor V Allelen aus Natriumcitrat- oder EDTA-Vollblut. Der Test wird auf dem Cepheid GeneXpert® Dx System durchgeführt. Dieser Test dient zur Bereitstellung von Ergebnissen für Faktor II (G20210A) und Faktor V Leiden (G1691A) Mutationen zur Unterstützung der Diagnose von Patienten mit Verdacht auf eine Thrombophilie.

Prinzip und Zusammenfassung

Der Zusammenhang von Faktor II (G20210A) und Faktor V Leiden (G1691A) Mutationen mit einem erhöhten Risiko für venöse Thrombosen ist sehr gut dokumentiert.^{1, 2, 3, 4} Die Faktor II oder Prothrombin (G20210A) Mutation ist ein G nach A Wechsel am Nukleotid 20210 in der 3' untranslatierten Region des Gens und führt zu erhöhten Plasmaspiegeln von Prothrombin. Faktor V Leiden (G1691A) ist ein G nach A Wechsel am Nukleotid Position 1691 des Faktor V Gens und führt zu einem Austausch der Aminosäure Arginin durch Glutamin im Faktor V Protein. Dieses wiederum bedingt eine Resistenz für die Spaltung durch aktiviertes Protein C (APC).

Die Häufigkeiten von Faktor II (G20210A) und Faktor V Leiden (G1691A) Mutationen in der Normalbevölkerung liegen bei 2% bzw. 5%.⁷

Testmethode

Das GeneXpert Dx System automatisiert und integriert die Probenreinigung, Nukleinsäure-Amplifikation und Detektion der Target-Sequenz im Vollblut mittels der real-time PCR Untersuchung. Das System besteht aus einem Analysengerät, einem Computer, einem Hand-Barcodescanner und einer vorinstallierten Software, die die Messung von Testen und die Visualisierung der Ergebnisse ermöglicht. Es erfordert den Einsatz von single-use Einwegkartuschen, die die PCR-Reagenzien beinhalten und zur Durchführung des PCR-Prozesses dienen. Da die Kartuschen verschlossen sind, ist eine Kreuz-Kontamination zwischen Proben ausgeschlossen. Die ausführliche Beschreibung des Systems ist dem GeneXpert Dx Geräte-Bedienerhandbuch zu entnehmen.

Der Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit beinhaltet Reagenzien für die Bestimmung von normalen und mutanten Faktor II und Faktor V Allelen aus Natriumcitrat- oder EDTA-Vollblut. Jeder Testkit enthält eine Probenverarbeitungskontrolle (PVK), die die Reagenz-Rehydrierung, die korrekte Befüllung mit PCR Reagenz in der Kartusche, die Probenintegrität und die Farbstoff-Stabilität überprüft.

Die Primer und Sonden im Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit bestimmen den Genotyp des Faktor II Gens (an der Position 20210) und/oder den des Faktor V Gens (an der Position 1691).

Reagenzien und System



Inhalt

Der Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit enthält ausreichend Reagenzien zur Durchführung von 10 Proben oder Qualitätskontrollen. Folgende Komponenten sind in der Packung enthalten:

- Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Kartuschen mit integrierten Reaktionskammern 10
- Bead 1 (gefriergetrocknet) 1 pro Kartusche
 - Polymerase
 - dNTP's
 - bovines Serumalbumin (BSA)
- Bead 2 (gefriergetrocknet) 1 pro Kartusche
 - Primer
 - Sonden
 - BSA
- Reagenz 1 (Tris Puffer, EDTA, Tween® 20) (TET) 3,0 mL pro Kartusche
- Reagenz 2 (Tris Puffer, GHCl, Sarkosyl, Tween 20) (GHCl) 3,0 mL pro Kartusche
- CD
 - Testdefinition (ADF)
 - Anleitung für den Import des ADF in die GX-Software
 - Packungsbeilage

Lagerung und Haltbarkeit



- Lagern Sie die Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Kartuschen und Reagenzien bei 2-28 °C.
- Verwenden Sie keine Kartuschen mit abgelaufenem Verfalldatum.
- Öffnen Sie die Kartusche erst, wenn Sie bereit sind, die Testung durchzuführen.
- Verwenden Sie die Kartuschen innerhalb von 30 Minuten nach Öffnen des Deckels.



Zusätzlich benötigte Materialien

- GeneXpert Dx System (Artikelnummer abhängig von der Konfiguration): GeneXpert Gerät, Computer, Barcode Scanner und *GeneXpert Dx Geräte-Bedienerhandbuch*.

Hinweis: Die Artikelnummer des GeneXpert Dx Systems variiert je nach Konfiguration, bitte kontaktieren Sie hierzu Cepheid.

- GeneXpert Dx Software 4.0 oder höher.
- Pipette mit Aerosol resistenten Pipettenspitzen zur Pipettierung von 50 µL Natriumcitrat- oder EDTA-Vollblut.
- HemosIL FII & FV DNA Kontrolle, Art. Nr. 0020003500

Warnung und Vorsichtsmaßnahmen



- Gesundheitsschädlich beim Verschlucken (R22). Reizt die Augen und Haut (R36/38).
- Behandeln Sie alle biologischen Proben, inklusive der benutzten Kartuschen, als mögliche Überträger von infektiösen Erregern. Oft ist es nicht vorher zu sehen, welcher Bestandteil infektiös sein könnte, daher sollten alle biologischen Proben mit den allgemeinen Vorsichtsmaßnahmen behandelt werden. Richtlinien zur Probenbehandlung sind erhältlich bei den U.S. Centers for Disease Control and Prevention⁵ und dem Clinical and Laboratory Standards Institut (ehemals National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁶
- Beachten Sie Ihre laborinternen Sicherheitsvorschriften zum Umgang mit Chemikalien und biologischen Probenmaterialien.
- Verwenden Sie die Kartuschen vor Ablauf des auf dem Testkit angegebenen Verfalldatums.
- Öffnen Sie den Deckel der Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Kartusche nur, wenn die Probe zugefügt werden soll.
- Verwenden Sie keine Kartusche, die umgefallen ist oder geschüttelt wurde, nachdem die Probe pipettiert wurde.
- Verwenden Sie keine Kartusche mit beschädigten Reaktionskammern.



- Jede Einmalkartusche Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V ist zur Durchführung eines Testes vorgesehen. Benutzte Kartuschen nicht wieder verwenden.
- Kontaktieren Sie den Umweltbeauftragten für Abfallentsorgung Ihrer Institution für die sachgerechte Entsorgung von benutzten Kartuschen und unbenutzten Reagenzien. Diese Materialien können Eigenschaften aufweisen, die dem Bundesamt der Vereinigten Staaten EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA) für gefährlichen Abfall unterliegen und daher spezifische Abfallbeseitigungsvorschriften erfordern. Überprüfen Sie die staatlichen und lokalen Vorschriften, da diese von den Bundesvorschriften der Vereinigten Staaten abweichen können. Institutionen außerhalb der USA sollten die Ländervorschriften für die Entsorgung von gefährlichem Abfall überprüfen.



- Lagern Sie die Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkartuschen bei 2-28 °C.
- Öffnen Sie den Deckel der Kartusche erst, wenn Sie bereit sind, die Testung durchzuführen.
- Im Fall eines internen Druckanstieges über die vom Hersteller festgelegte Grenze, wird der Lauf automatisch abgebrochen und ein FEHLER-Ergebnis angezeigt.
- Für alle Reagenzien dieser Untersuchung sind Sicherheitsdatenblätter (MSDS, Material Safety Data Sheet) beim Technischen Support von Cepheid und auf Cepheids Webseites www.Cepheid.com, www.cepheidinternational.com auf Anfrage erhältlich.
- Das bovine Serumalbumin (BSA) in diesem Produkt wurde ausschließlich aus bovinen Plasmaquellen in den USA gewonnen. Die Produktion des BSA erfolgte ebenfalls in den Vereinigten Staaten. Die Tiere wurden weder mit Proteinen von Wiederkäuern noch anderen Tieren gefüttert. Die Tiere durchliefen erfolgreich die ante- und post-mortem Testung. Während der Weiterverarbeitung fand keine Durchmischung mit anderen tierischen Materialien statt.

Probengewinnung und Lagerung



Folgendes Sie der Anleitung in diesem Absatz zur Gewinnung von geeignetem Probenmaterial.

1. Nur ausgebildetes und autorisiertes Personal sollte Blut in EDTA- oder Natriumcitrat-Röhrchen abnehmen.
2. Die Blutproben dürfen nicht zentrifugiert werden oder durch Entnahme von Plasma konzentriert werden.
3. Die Blutproben sollten bei Lagerung bei Raumtemperatur (22-28 °C) innerhalb von 24 Stunden bearbeitet werden. Die Lagerung über 24 Stunden sollte bei 2-8 °C erfolgen. Die Blutproben sind bei Lagerung bei 2-8 °C bis zu 15 Tage stabil. Die Proben können auch bei -20 °C oder -80 °C bis zu 3 Monate aufbewahrt werden. Die Verwendung eines gefriertauglichen Gefäßes wird empfohlen.

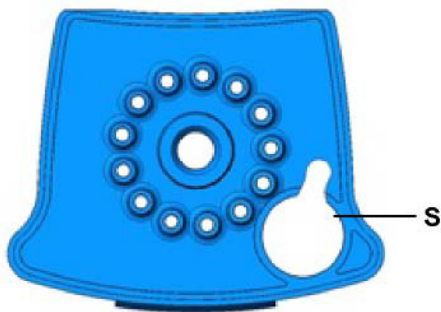
Alle eingefrorenen Blutproben sollten bei Raumtemperatur vollständig aufgetaut werden. Es wird empfohlen die Blutproben nicht mehr als einmal einzufrieren und wieder aufzutauen.

4. Mischen Sie die Probe fünfmal über Kopf, bevor sie in die Kartusche pipettiert wird.

Durchführung

Vorbereitung der Kartusche

Wichtig: Starten Sie den Test innerhalb von 15 Minuten, nachdem Sie die Probe in die Kartusche gegeben haben.



S = Probe

Figure 1. Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkartusche (Blick von oben)

Beim Zufügen der Probe in die Kartusche bitte beachten:

1. Entnehmen Sie die Kartusche aus dem Testkit.
2. Die Kartusche muss vor Verwendung nicht auf Raumtemperatur vorgewärmt werden.
3. Mischen Sie das Probengefäß mehrmals über Kopf, bis es homogen ist.
4. Öffnen Sie den Deckel der Kartusche. Verwenden Sie eine Pipette mit einer Aerosol resistenten Pipettenspitze und überführen Sie 50 µL der Natriumcitrat- oder EDTA-antikoagulierten Blutprobe auf den Boden der „S“-Kammer der Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Kartusche.
5. Verschließen Sie den Deckel der Kartusche.

Starten des Tests

Wichtig: Vergewissern Sie sich, dass die Xpert HemosIL FII, Xpert HemosIL FV und Xpert HemosIL FII & FV Kombi Testdefinitionen in das System importiert wurden, bevor Sie den Test starten. Die Testdefinitionen werden auf einer CD zur Verfügung gestellt.

Dieser Abschnitt beinhaltet die wichtigsten Schritte zur Durchführung des Tests. Die ausführliche Beschreibung ist dem *GeneXpert Dx Geräte-Bedienerhandbuch* zu entnehmen.

1. Schalten Sie das GeneXpert Dx System ein und anschließend den Computer. Die GeneXpert Software startet automatisch.
2. Loggen Sie sich in die GeneXpert Dx Gerätesoftware ein, indem Sie Ihren Benutzernamen und Ihr Passwort eingeben.
3. Wählen Sie in der GeneXpert Dx Systemsoftware **Create Test** an. Es öffnet sich ein entsprechendes Fenster.
4. Scannen Sie den Barcode der Kartusche.
5. Im Feld Sample ID (Proben ID) können Sie die Proben-Identifikationsnummer eingeben. Vergewissern Sie sich, dass die Proben ID korrekt eingegeben wurde. Alternativ kann der Probenbarcode eingelesen werden. Die Proben ID wird dem Testergebnis zugeordnet und wird im Fenster **View Results** und auf allen Ausdrucken angezeigt.

Name	Version
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FV	1
Xpert HemosIL FII & FV Combo	1

Figure 2. Fenster: Create Test

6. Wählen Sie aus dem Drop-down Menü der Testliste den entsprechenden Test aus, der durchgeführt werden soll.
7. Wählen Sie Start Test. Die Software fordert Sie zur Eingabe Ihres Passwortes auf.
8. Öffnen Sie die Instrumentenmodulkappe, bei der eine grüne Anzeigeleuchte blinkt und laden Sie die Kartusche.
9. Schließen Sie die Klappe. Der Test wird gestartet, die grüne Anzeigeleuchte blinkt nicht mehr. Nach Beenden des Tests erlischt die grüne Anzeige.

10. Wenn das System die Tür entriegelt, öffnen Sie die Modulklappe und entfernen Sie die Kartusche.
11. Entsorgen Sie die benutzten Kartuschen in einem geeigneten Abfallbehälter, beachten Sie Ihre laborinternen Sicherheitsvorschriften.

Anzeige und Ausdruck von Testergebnissen

Die ausführliche Beschreibung ist dem GeneXpert Dx Geräte-Bedienerhandbuch zu entnehmen.

CONTROL Qualitätskontrolle

Jeder Testkit beinhaltet eine Probenverarbeitungskontrolle (PVK).

Probenverarbeitungskontrolle (PVK) – Vor dem Start der PCR Reaktion misst das GeneXpert Dx System das Fluoreszenzsignal der Probe um die Reagenz-Rehydrierung, die korrekte Befüllung in der Kartusche, die Probenintegrität und die Farbstoff-Stabilität zu überprüfen. Die PVK gilt als bestanden, wenn die festgelegten Akzeptanzkriterien erfüllt sind.

Externe Kontrollen – Die HemosIL FII & FV DNA Kontrolle (Art. Nr. 0020003500) wurde für das externe Qualitätsprogramm des Xpert HemosIL FII & FV Testes hergestellt und validiert.

Alternativ können normale, heterozygote oder homozygote Faktor II/Faktor V Vollblutproben (Natriumcitrat- oder EDTA-antikoaguliert) zu Übungszwecken, als Leistungstest und als externe Qualitätskontrolle für den Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Test verwendet werden. Zellbasiertes Material ist notwendig. Verwenden Sie keine extrahierte DNA. Externe Qualitätskontrollen sollten, in Abhängigkeit von der Zuständigkeit, in Übereinstimmung mit den jeweiligen Vorschriften der lokalen, regionalen und staatlichen Organisationen durchgeführt werden.

Interpretation der Ergebnisse

Die Ergebnisse werden vom GeneXpert Dx System durch die gemessenen Fluoreszenzsignale und die eingebauten Algorithmen interpretiert um den Genotyp zu identifizieren; Anzeige der Ergebnisse in den folgenden Fenstern:

Für Xpert HemosIL FII Messergebnisse (Abbildungen 3 - 5).

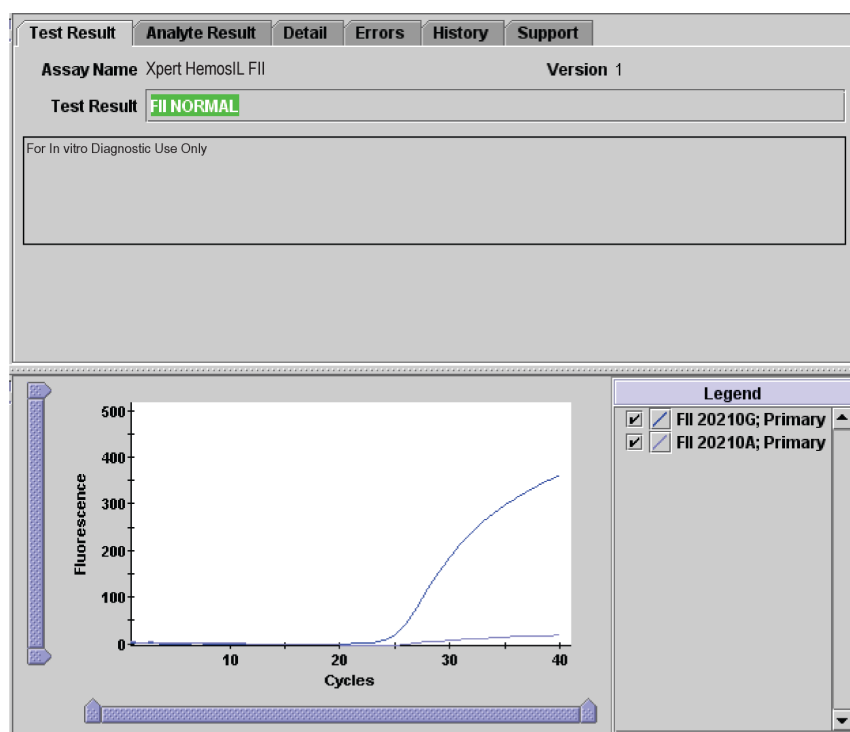


Figure 3. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, normales Messergebnis für FII

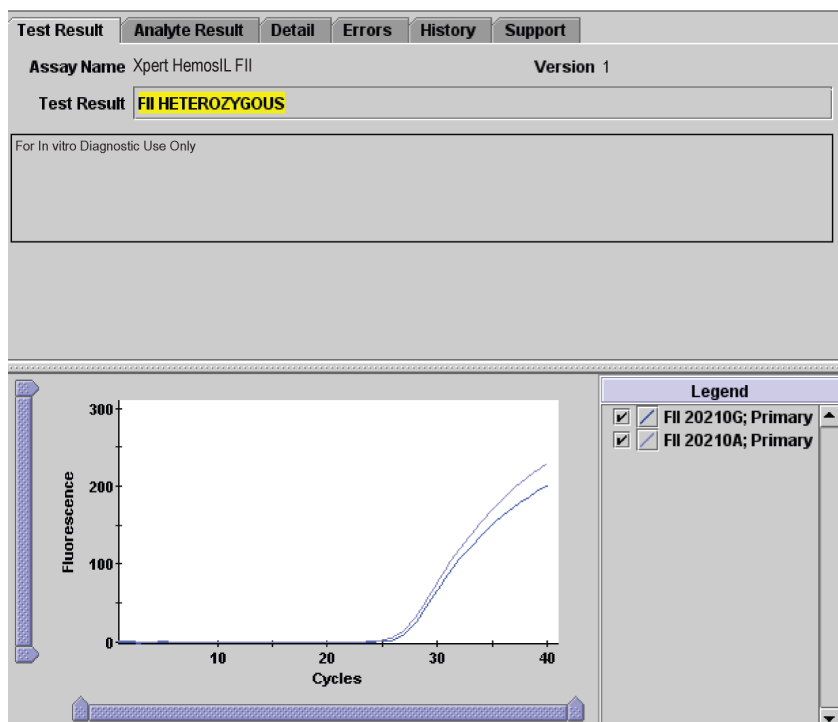


Figure 4. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, heterozygotes Messergebnis für FII

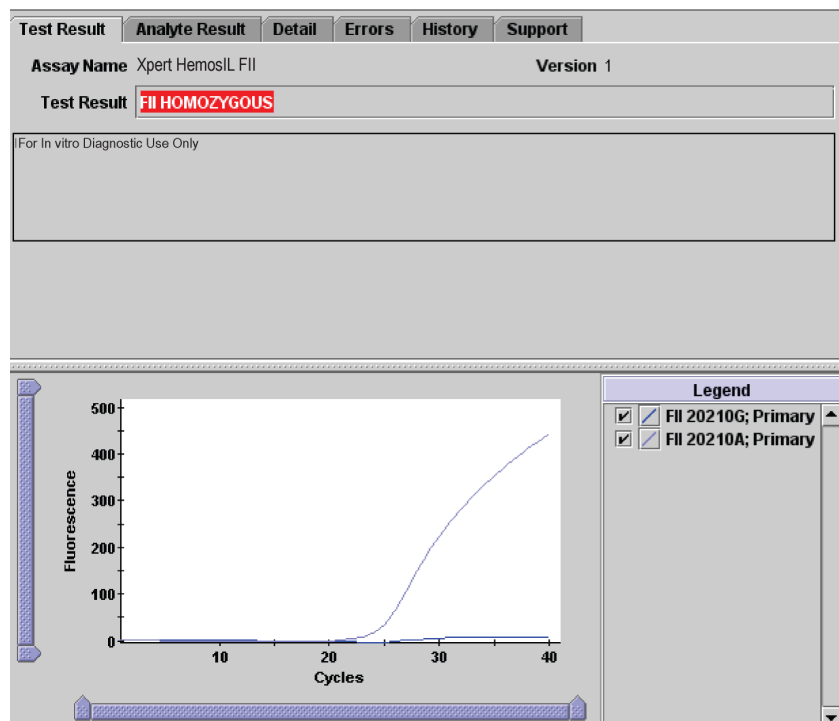


Figure 5. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, homozygotes Messergebnis für FII

Für Xpert HemosIL FV Messergebnisse (Abbildungen 6 - 8).

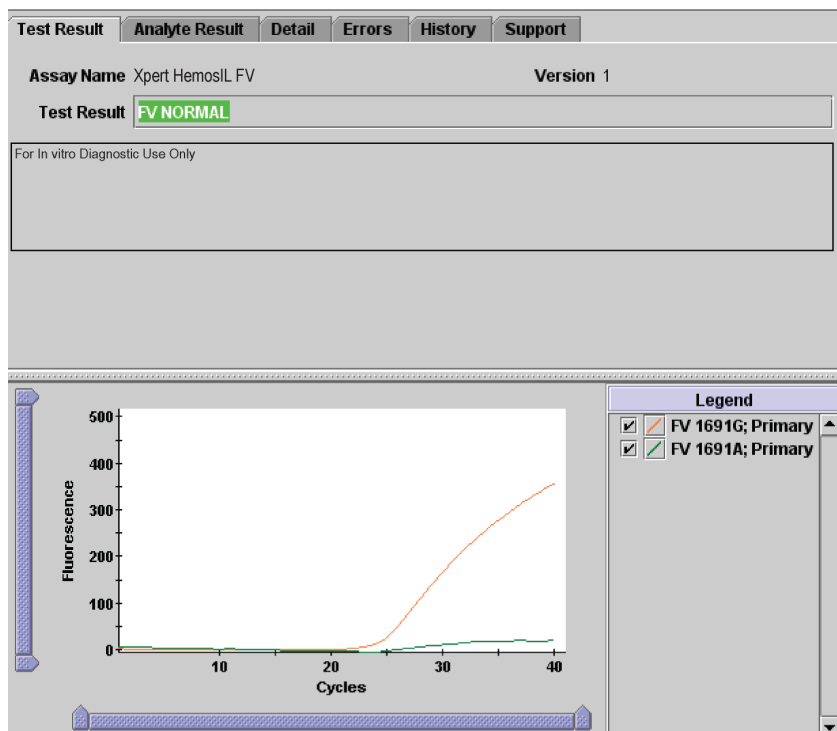


Figure 6. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, normales Messergebnis für FV

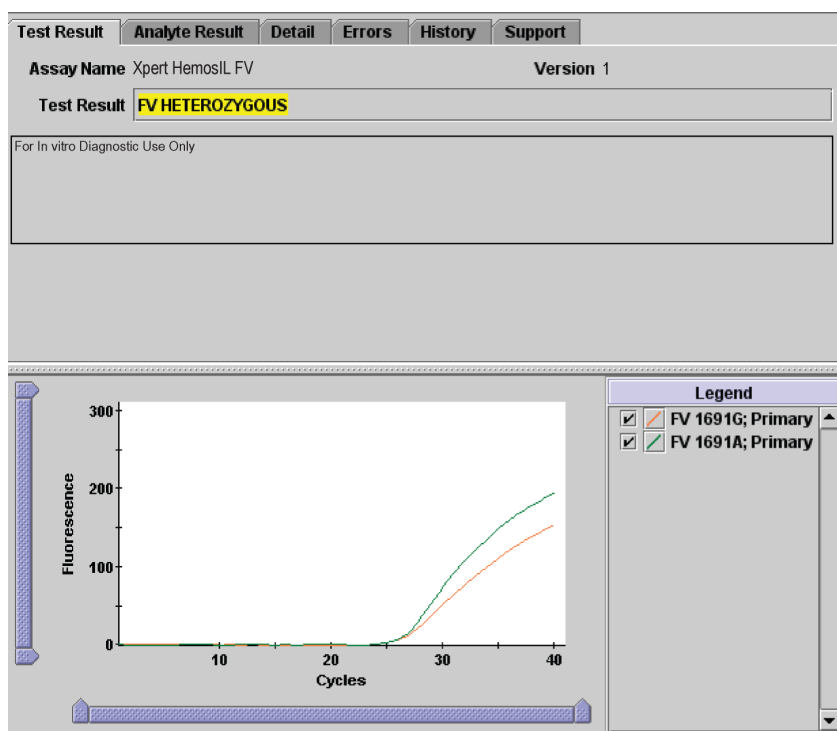


Figure 7. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, heterozygotes Messergebnis für FV

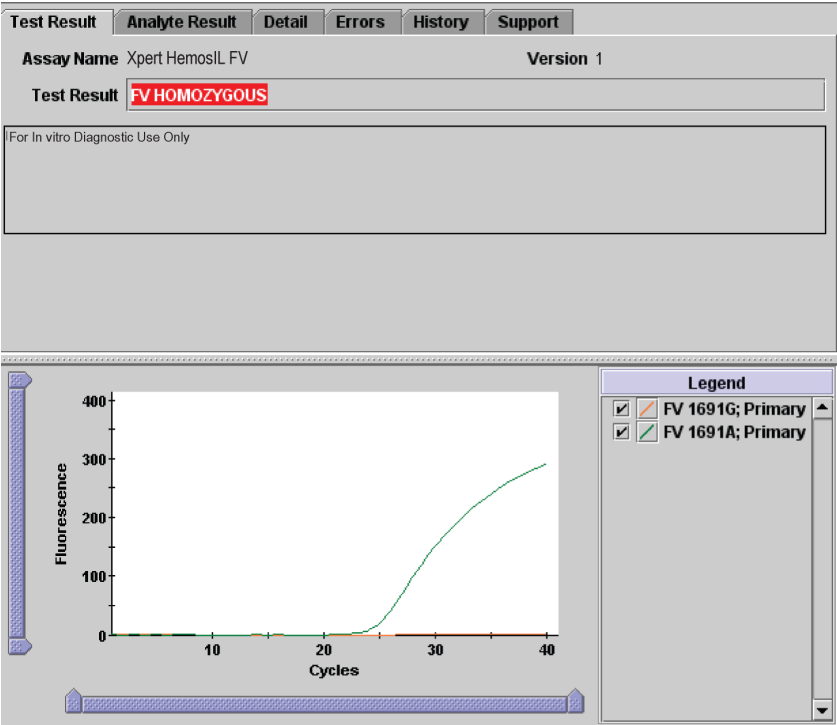


Figure 8. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, homozygotes Messergebnis für FV

Für Xpert HemosIL FII & FV Kombi Messergebnisse (Abbildungen 9 - 11).

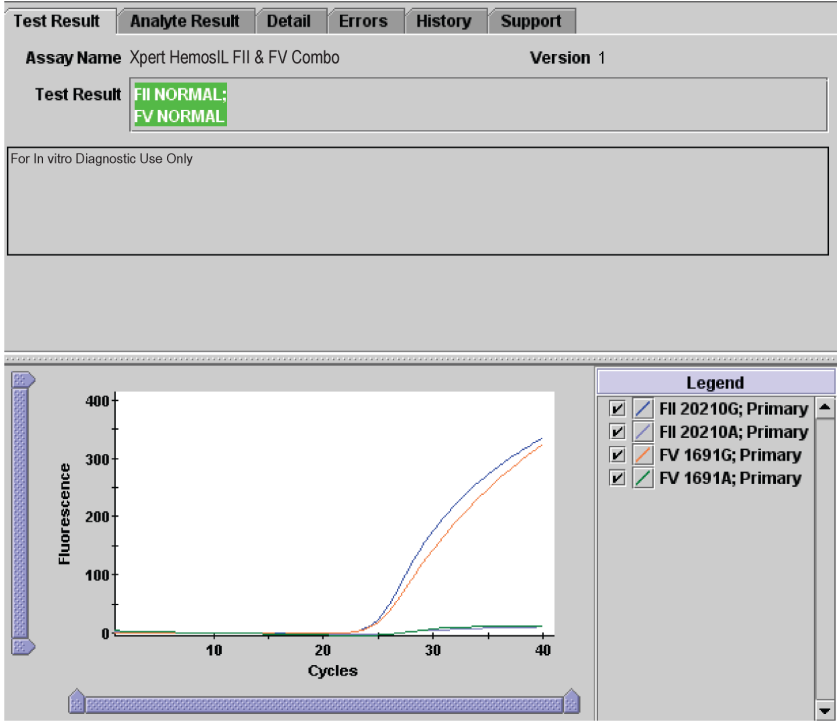


Figure 9. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, normales Messergebnis für FII & FV

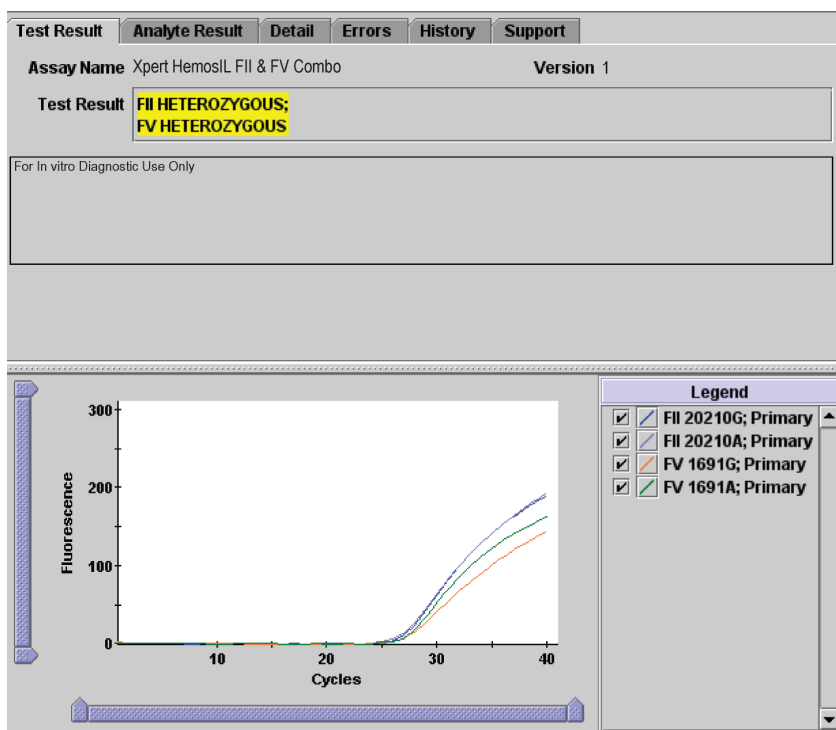


Figure 10. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, heterozygotes Messergebnis für FII & FV

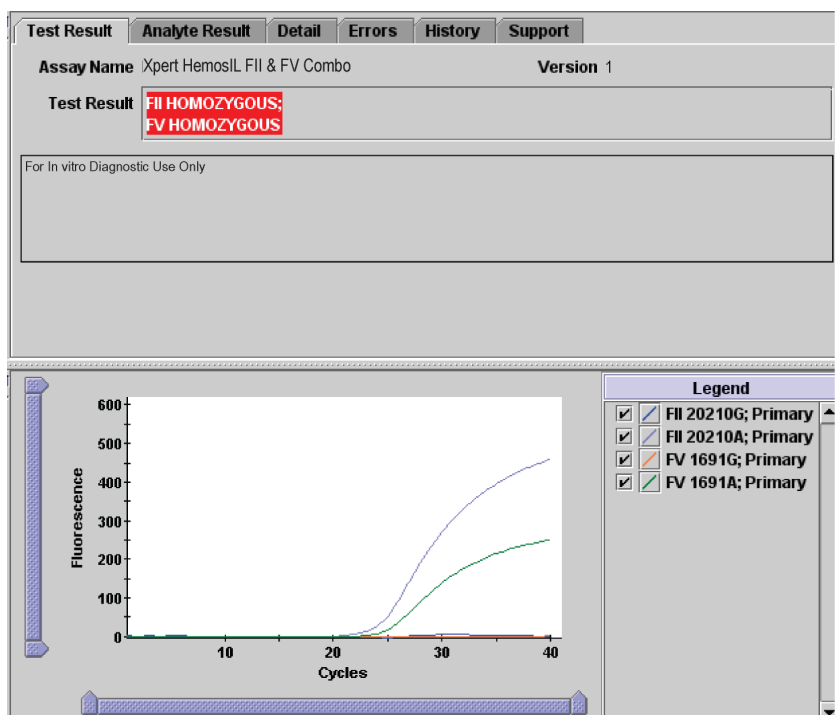


Figure 11. GeneXpert Dx System – Fenster: Ergebnisanzeige, homozygotes Messergebnis für FII & FV

Invalides Ergebnis

Die An- oder Abwesenheit von Faktor II / Faktor V normalen und mutanten Allelen konnte nicht bestimmt werden, wiederholen Sie den Test nach der unten aufgeführten Anleitung. Die Probe wurde nicht richtig aufbereitet oder die PCR wurde gehemmt.

- Invalides Ergebnis—Die An- oder Abwesenheit von Faktor II / Faktor V normalen und mutanten Allelen konnte nicht bestimmt werden.
- PVK—bestanden; alle Probenchecks wurden bestanden.

Fehlerhaftes Ergebnis

Die An- oder Abwesenheit von Faktor II / Faktor V normalen und mutanten Allelen konnte nicht bestimmt werden, wiederholen Sie den Test nach der unten aufgeführten Anleitung. Die PVK bringt ein fehlerhaftes Ergebnis und der Test wurde möglicherweise auf Grund von unsachgemäßer Füllung der Reaktionskammern oder Probenintegrationsproblemen abgebrochen. Fehler können ebenso auf Grund von Überschreitungen der maximalen Druckbegrenzung oder eines Fehlers einer Systemkomponente auftreten.

- Fehler
- PVK—Fehler*; einer oder mehrere Probenchecks wurden nicht bestanden.

* Falls die PVK keinen Fehler anzeigt, liegt die Ursache in einem Systemkomponentenfehler.

Kein Ergebnis

Die An- oder Abwesenheit von Faktor II / Faktor V normalen und mutanten Allelen konnte nicht bestimmt werden, wiederholen Sie den Test nach der unten aufgeführten Anleitung. Unzureichende Daten wurden erfasst um ein Testergebnis zu erzielen (z.B. Anwender hat den Test während des Messvorgangs gestoppt).

- Kein Ergebnis
- PVK—NA (nicht durchführbar)

Gründe für eine Testwiederholung

Wiederholen Sie den Test mit einer neuen Kartusche (benutzte Kartuschen nicht wieder verwenden), neuen Flüssigreagenzien 1 und 2 und einem neuen Aliquot der Natriumcitrat- oder EDTA-antikoagulierten Vollblutprobe:

- Ein invalides Ergebnis zeigt an, dass die Probe nicht korrekt aufbereitet oder die PCR gehemmt wurde.
- Ein fehlerhaftes Ergebnis zeigt an, dass ein Fehler bei der PVK aufgetreten ist und der Test möglicherweise auf Grund von unsachgemäßer Füllung der Reaktionskammern oder Probenintegrationsproblemen abgebrochen wurde. Fehler können ebenso auftreten bei Überschreitungen der maximalen Druckbegrenzung oder Systemkomponentenfehlern.
- Die Anzeige kein Ergebnis zeigt an, dass unzureichende Daten erfasst wurden, z.B. hat der Anwender den Test während des Messvorgangs gestoppt.

Einschränkungen

- Die Testcharakteristik des Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V wurde nur anhand der in dieser Packungsbeilage aufgeführten Anleitungen validiert. Änderungen dieser Anleitung können die Testcharakteristik verändern. Die Ergebnisse des Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkits sollten in Verbindung mit anderen, dem Kliniker zur Verfügung stehenden Laborergebnissen und klinischen Daten interpretiert werden.
- Seltene Faktor V Mutationen (G1696A, G1689A und A1692C) und jegliche zusätzliche SNPs in der Bindungsregion der Sonde können mit der Zielsequenz interferieren und zu einem invaliden Ergebnis führen.

Interferierende Substanzen

- Blutproben von Patienten unter Heparintherapie und von Patienten, die Bluttransfusionen erhalten haben, können unter Umständen zu Interferenzen bei den PCR Ergebnissen führen und ein invalides oder fehlerhaftes Ergebnis liefern.
- Untersuchungen mit potentiell interferierenden Substanzen haben keine Inhibition gezeigt bei Heparin bis zu 14,3 USP Units/mL, Bilirubin bis zu 16 mg/dL, zugefügtem Cholesterol bis zu 250 mg/dL oder Gesamttriglyceriden (Lipiden) bis zu 1932 mg/dL. Bei Verwendung von Vollblutproben, die einmalig eingefroren und wieder aufgetaut wurden, wurden keine Einschränkungen beobachtet (hämolyisiertes Blut). Bei Proben, die sowohl mit EDTA als auch mit Natriumcitrat antikoaguliert wurden, sind keine statistisch signifikanten Unterschiede festgestellt worden.

Erwartete Werte

Faktor II (G20210A) und Faktor V Leiden (G1691A) Mutationen treten bei 2% bzw. 5% der Bevölkerung auf.⁷

Testcharakteristik

Klinische Beurteilung

Die Testcharakteristik des Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Tests wurde in einer Multicenter-Studie an sieben Institutionen durch Vergleich des Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkits mit der bidirektionalen Sequenzierung bestimmt.

Es wurden die Vollblutproben eingesetzt, die routinemäßig zur Bestimmung von Faktor II und/oder Faktor V bestimmt waren. Zuerst wurden die Proben mit der Routinemethode jedes teilnehmenden Labors bestimmt und anschließend Aliquots für die Studientestung mit dem Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit am GeneXpert-System gesammelt. Die extrahierte DNA wurde zur Durchführung der bidirektionalen Sequenzierung an ein Vertragslabor verschickt.

Die Testcharakteristik des Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit wurde in Relation zu den Ergebnissen der bidirektionalen Sequenzierung kalkuliert.

Gesamtcharakteristik

Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit

Insgesamt wurden 1018 Proben für Faktor II sowohl mit dem Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Test und der bidirektionalen Sequenzierung getestet. Insgesamt wurden 1014 Proben für Faktor V sowohl mit dem Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Test und der bidirektionalen Sequenzierung untersucht. Zur Aufstockung der Anzahl homozygoter Proben wurden sechs humane genomische DNA Proben, homozygot für Faktor II, und fünf Proben, homozygot für Faktor V, mit dem Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit und der bidirektionalen Sequenzierung getestet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Der Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit zeigt eine Gesamtübereinstimmung von 99,3 % in Relation zur bidirektionalen Sequenzierung sowohl für Faktor II als auch für Faktor V.

Tableau 1. Xpert HemosIL vs. Bidirektionaler Sequenzierung

Genotyp	Anzahl gesamt	Anzahl korrekter Ergebnisse im ersten Lauf	Anzahl invalider ^a Ergebnisse im ersten Lauf	Überein- stimmung im ersten Lauf	Anzahl korrekter Ergebnisse incl. Wiederholung	Anzahl invalider ^a Ergebnisse in der Wiederholung	Überein- stimmung nach Wiederholung
Faktor II G20210A							
Wildtyp^d	968	927	41	95.8%	963	5	99.5%
Heteroz.	50	48	2	96.0%	48	2	96.0%
Homoz.	7	7	0	100.0%	7	0	100%
Gesamt	1025 ^b	982	43	95.8%	1018	7	99.3%
Faktor V G1691A							
Wildtyp	895	860	35	96.1%	889	6	99.3%
Heteroz.	114	108	6	94.7%	113	1	99.1%
Homoz.	12	11	1	91.7%	12	0	100.0%
Gesamt	1021 ^c	979	42	95.9%	1014	7	99.3%

^aKeine diskrepanten Ergebnisse. Invalides Resultat auf Grund „nicht bestimmbar“ Ergebnis.^bErgebnis der bidirektionale Sequenzierung für Faktor II war nicht verfügbar für 4 Proben.^cErgebnis der bidirektionale Sequenzierung für Faktor V war nicht verfügbar für 8 Proben.^dWildtyp ist normal.

Analytische Spezifität

Zur Bestimmung der analytischen Spezifität des Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkits wurden normale Gensequenzen mit SNPs (silent single nucleotide polymorphisms) in der Sondenbindungsregion und außerhalb der Sondenbindungsregion hergestellt. Die Anwesenheit von zusätzlichen SNPs in der Sondenbindungsregion führte in den meisten Fällen zu invaliden Ergebnissen. Wenn ein valides Ergebnis bestimmt wurde, wurde auch der korrekte Genotyp angegeben.

Die Anwesenheit von zusätzlichen SNPs außerhalb der Sondenbindungsregion führte zu korrekter Genotypisierung.

Analytische Sensitivität

Es wurden Studien durchgeführt um die minimal und maximal benötigte Probenmenge für EDTA- und Natriumcitrat-antikoagulierte Vollblut zu bestimmen, um den korrekten Genotyp zu bestimmen unter der Voraussetzung, dass die Untergrenze des 95 % Konfidenzintervalls für die kalkulierten „korrekten Ergebnisse“ größer als 95 % liegt.

EDTA- und Natriumcitrat-antikoagulierte Vollblutproben wurden mit acht verschiedenen Volumina von 5 µL bis 250 µL (n=20) getestet.

Obwohl der Test Volumina von 15 µL bis 100 µL tolerieren kann, liegt das empfohlene Probevolumen bei 50 µL zur Minimierung des Risikos für fehlerhafte Ergebnisse auf Grund von zu geringem oder erhöhtem Probevolumen.

Reproduzierbarkeit

Ein Panel von 5 Proben, die jeden unten aufgeführten Probentyp beinhaltet haben, wurden in Doppelbestimmung von zwei unterschiedlichen Anwendern an fünf verschiedenen Tagen an 3 Zentren untersucht (5 Proben x zweimal täglich x 2 Anwender pro Zentrum x 5 Tage x 3 Zentren). Es wurde jeweils eine Charge Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Testkit an einer der drei Zentren eingesetzt. Die Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Tests wurden analog der Xpert HemosIL Faktor II & Faktor V Applikation untersucht. Die Ergebnisse sind in den Tabellen 2-5 zusammengefasst.

Studien-Panel:

1. eine Probe mit normalen (Wildtyp) Allelen für Faktor II & Faktor V;
2. eine Probe mit heterozygoter Faktor II Mutation (d.h. ein mutantes und ein Wildtyp Allel für Faktor II Gen) und mit normalen (Wildtyp) Allelen für Faktor V;
3. eine Probe mit homozygoter Faktor II Mutation (d.h. zwei mutante Allele für Faktor II Gen) und mit normalen (Wildtyp) Allelen für Faktor V;
4. eine Probe mit normalen (Wildtyp) Allelen für Faktor II und homozygoter Faktor V Mutation (d.h. zwei mutante Allele für Faktor V Gen);
5. eine Probe mit normalen (Wildtyp) Allelen für Faktor II und heterozygoter Faktor V Mutation (d.h. ein mutantes und ein Wildtyp Allel für Faktor V Gen).

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse pro Zentrum ist in Tabelle 2 und 3 aufgeführt. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Zentren für Faktor II ($p=1.000$) oder Faktor V ($p=1.000$) festgestellt.

Tableau 2. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit pro Zentrum – Faktor II

Probentypen	Zentrum 1	Zentrum 2	Zentrum 3	% Gesamt-Übereinstimmung pro Probe
Normal	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Heteroz./ Faktor V Normal	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Homoz./ Faktor V Normal	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Homoz.	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Heteroz.	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Gesamt-Übereinstimmung pro Zentrum	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Keine diskrepanten Ergebnisse. Eine Probe war auch nach Wiederholung nicht zu ermitteln.

Tableau 3. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit pro Zentrum – Faktor V

Probentypen	Zentrum 1	Zentrum 2	Zentrum 3	% Gesamt- Übereinstimmung pro Probe
Normal	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Heteroz./ Faktor V Normal	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Homoz./ Faktor V Normal	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Homoz.	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Heteroz.	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Gesamt- Übereinstimmung pro Zentrum	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Keine diskrepanten Ergebnisse. Eine Probe war auch nach Wiederholung nicht zu ermitteln.

Eine Zusammenfassung der Ergebnisse pro Anwender ist in Tabelle 4 und 5 aufgeführt. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den Zentren für Faktor II (p= 1.000) oder Faktor V (p=1.000) festgestellt.

Tableau 4. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit pro Anwender – Faktor II

Probentypen	Zentrum 1		Zentrum 2		Zentrum 3		% Gesamt- Übereinstimmung pro Probe
	Anw. 1	Anw. 2	Anw. 1	Anw. 2	Anw. 1	Anw. 2	
Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Heteroz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Homoz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Homoz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Heteroz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Gesamt- Übereinstimmung pro Anwender	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Keine diskrepanten Ergebnisse. Eine Probe war auch nach Wiederholung nicht zu ermitteln.

Tableau 5. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit pro Anwender – Faktor V

Probentypen	Zentrum 1		Zentrum 2		Zentrum 3		% Gesamt- Übereinstimmung pro Probe
	Anw. 1	Anw. 2	Anw. 1	Anw. 2	Anw. 1	Anw. 2	
Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Heteroz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Homoz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Homoz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Faktor II Normal/ Faktor V Heteroz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Gesamt- Übereinstimmung pro Anwender	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Keine diskrepanten Ergebnisse. Eine Probe war auch nach Wiederholung nicht zu ermitteln.

Zur Ermittlung der Reproduzierbarkeit innerhalb der verwendeten Chargen wurde das Panel der fünf Proben, wie oben beschrieben, zweimal täglich über fünf Tage unter Verwendung der drei verschiedenen Testkit-Chargen in einem Zentrum untersucht (5 Proben x 2 Läufe pro Tag x 3 Chargen x 5 Tage). Eine Zusammenfassung der Ergebnisse pro Charge ist in Tabelle 6 und 7 aufgeführt. Es wurden keine statistisch signifikanten Unterschiede in den Ergebnissen zwischen den einzelnen Chargen für Faktor II ($p=1.000$) oder Faktor V ($p=1.000$) festgestellt.

Tableau 6. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit pro Charge – Faktor II

Probentypen	Charge 1	Charge 2	Charge 3	% Gesamt- Übereinstimmung pro Probe
Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Heteroz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Homoz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Normal/ Faktor V Homoz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Normal/ Faktor V Heteroz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Gesamt-Übereinstimmung pro Charge	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Tableau 7. Zusammenfassung der Reproduzierbarkeit pro Charge – Faktor V

Probentypen	Charge 1	Charge 2	Charge 3	% Gesamt- Übereinstimmung pro Probe
Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Heteroz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Homoz./ Faktor V Normal	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Normal/ Faktor V Homoz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Faktor II Normal/ Faktor V Heteroz.	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Gesamt-Übereinstimmung pro Charge	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Literatur

1. Thrombophilia as a multigenic disease. B. Zoeller, P.G. de Frutos, A. Hillarp., B. Dahlback. *Haematologica* 1999; 84:59-70.
2. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. V. De Stefano, E. Rossi, K. Paciaroni, G. Leone. *Haematologica* 2002; 87:1095 – 1108.
3. Laboratory investigation of thrombophilia. A Tripodi and P.M. Mannucci. *Clinical Chemistry* 2001; 47:1597 – 1606
4. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin G20210A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Elaine B. Spector, Wayne W. Grody, Carla J. Matteson, , Glenn E. Palomaki, Daniel B. Bellissimo,, Dayna J. Wolff, Linda A. Bradley, , Thomas W. Prior, Gerald Feldman, Bradley W. Popovich, Michael S. Watson, and C. Sue Richards *ACMG Standards and Guidelines* July/August 2005, Vol. 7, No. 6.
5. Centers of Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, et al. American college of medical genetic consensus statement on factor V leiden mutation testing. *Genetics in Medicine*. 2001;3(2):139-148.

Tabelle der Symbole

Tablelle 8. Symbolbedeutung

Symbol	Bedeutung
	Bestellnummer
	<i>In vitro</i> -Diagnostikum
	Nicht wieder verwenden
	Achtung, beigefügtes Dokument zu Rate ziehen
	Hersteller
	Inhalt ausreichend für <n> Tests
	Kontrolle
	CE-Kennzeichnung – Einhaltung der EU-Richtlinien
	Bevollmächtigter in der Europäischen Gemeinschaft
	Temperatureinschränkungen
	Biologische Gefahr

Hersteller

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Tel: +1.408.541.4191
Fax: +1.408.541.4192

Autorisierte Vertretung

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00
Fax: +33.563.82.53.01

Exklusiver Vertrieb durch

 **Instrumentation Laboratory**



Para su uso en Diagnóstico médico *in vitro*

Nombre patentado

Xpert® HemosIL® FII & FV

Nombre habitual o común

Ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Aplicación

El ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V es un test cualitativo de diagnóstico *in vitro* de genotipado para la detección rápida de los alelos para el Factor II y el Factor V utilizando sangre total anticoagulada con citrato sódico o EDTA. El test se procesa en el Sistema de Cepheid GeneXpert® Dx. Este test se utiliza para proporcionar resultados para las mutaciones del Factor II (G20210A) y Factor V Leiden (G1691A) como ayuda en el diagnóstico en individuos con sospecha de presentar trombofilia.

Resumen

La asociación de las mutaciones Factor II (G20210A) y Factor V Leiden (G1691A) con un riesgo aumentado de sufrir trombosis venosa está muy bien documentada^{1, 2, 3, 4}. La mutación del Factor II o Protrombina (G20210A) se refiere a la transición de una G por una A en el nucleótido 20210 de la región 3' no traducida del gen, y se asocia a un incremento de los niveles plasmáticos de Protrombina. El Factor V Leiden (G1691A) se refiere a la transición de una G por una A en el nucleótido de la posición 1691 del gen del Factor V, lo que provoca una sustitución del aminoácido Arginina por Glutamina en la proteína Factor V, lo que la hace resistente a la acción inhibidora de la Proteína C Activada (APC).

Las mutaciones FII (G20210A) y Factor V (G1691A) están presentes en el 2% y 5% respectivamente de la población general.⁷

Principio del Método

El Sistema GeneXpert Dx automatiza e integra la purificación de la muestra, la amplificación de los ácidos nucleicos y la detección de la secuencia objetivo en sangre total, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en Tiempo Real. El sistema se compone de un instrumento y un ordenador personal, con un lector de código de barras, que lleva cargado el software para procesar tests y visualizar resultados. El sistema requiere del uso de cartuchos desechables de un solo uso que contienen los reactivos de la PCR y albergan todo el proceso de PCR. Los cartuchos al ser independientes eliminan la contaminación entre muestras. Para la descripción completa del sistema, consultar el *Manual del Operador del Sistema GeneXpert Dx*.

El kit Xpert HemosIL Factor II & Factor V contiene los reactivos para la detección de los alelos normales y mutados del Factor II y Factor V, utilizando sangre total anticoagulada con citrato sódico o EDTA. En cada cartucho se realiza un Chequeo de Comprobación de la Sonda (PPC) que verifica la rehidratación de los reactivos, el llenado del tubo de la PCR del cartucho, la integridad de la sonda y la estabilidad de la señal de la misma.

Los primers y las sondas del kit Xpert HemosIL Factor II & Factor V determinan el genotipado del gen del Factor II (en la posición 20210) y/o del gen del Factor V (en la posición 1691).

Reactivos e Instrumentación

Material suministrado

 El kit Xpert HemosIL Factor II & Factor V contiene los reactivos suficientes para procesar 10 muestras o controles de calidad. El kit incluye los componentes siguientes:

- Cartuchos Xpert HemosIL Factor II & Factor V con los tubos de reacción integrados 10
- Perla 1 (lío-filizado) 1 por cartucho
 - Polimerasa
 - dNTPs
 - Albúmina de Suero Bovino (BSA)
- Perla 2 (lío-filizado) 1 por cartucho
 - Primers
 - Sondas
 - BSA
- Reactivo 1 (Tris Buffer, EDTA, Tween® 20) (TET) 3,0 mL por cartucho
- Reactivo 2 (Tris Buffer, GHCl, Sarkosyl, Tween 20) (GHCl) 3,0 mL por cartucho
- CD
 - Archivo definición del test (ADF)
 - Instrucciones para importar el archivo ADF al software del GX
 - Ficha técnica

Almacenamiento y manejo

-  • Almacenar los cartuchos y los reactivos de Xpert HemosIL Factor II & Factor V a 2 - 28 °C.
- No utilizar cartuchos cuya fecha de caducidad haya vencido.
 - No abrir los cartuchos hasta el momento de procesar el test.
 - Utilizar el cartucho antes de que transcurran 30 minutos después de abrir la tapa.

Materiales necesarios pero no suministrados

- Sistema GeneXpert Dx (el número de catálogo depende de la configuración): instrumento GeneXpert, ordenador, escáner para código de barras, y el Manual del Operador del GeneXpert Dx.

Nota: El número de catálogo del sistema GeneXpert Dx depende de la configuración. Contactar con Cepheid para consultar la configuración requerida con su correspondiente número de catálogo.

- Versión de Software del GeneXpert Dx 4.0 o superior.
- Pipeta con puntas de filtro para dispensar 50 µL de sangre total anticoagulada con citrato o EDTA.
- HemosIL FII & FV DNA Control, P/N 0020003500.

Advertencias y Precauciones



- Nocivo si se ingiere (R22), irritante para ojos y piel (R36/38).



- Tratar todas las muestras biológicas, incluidos los cartuchos usados, como si fueran agentes potencialmente infecciosos. Debido a que a menudo no es posible conocer qué muestras son infecciosas, todas las muestras biológicas deberían tratarse con las precauciones generales. Las pautas para la manipulación de muestras se encuentran disponibles en los centros de Control y Prevención de Estados Unidos⁵ y en el Instituto de Estándares de Laboratorio y Clínico (antiguamente Comité Nacional de Estandarización del Laboratorio Clínico).⁶
- Seguir los procedimientos de seguridad de sus instituciones para trabajar con la manipulación de muestras biológicas y químicas.
- Utilizar los cartuchos antes de la fecha de caducidad indicada en el kit.
- No abrir la tapa del cartucho del test Xpert HemosIL Factor II & Factor V excepto cuando se dispense la muestra.
- No utilizar cartuchos que se hayan caído o hayan sido agitados después de dispensar la muestra.
- No utilizar cartuchos que tengan el tubo de reacción dañado (por ejemplo, roto o doblado).



- Cada cartucho del test Xpert HemosIL Factor II & Factor V es de un solo uso y se utiliza para procesar un test. No reutilizar cartuchos usados.
- Siga las normas de seguridad de su institución para desechar de forma adecuada los cartuchos usados y los reactivos no usados. Este material tiene que seguir las directrices de la EPA y de la Agencia de Protección ambiental de los EEUU para el desecho de materiales peligrosos. Se deben comprobar las reglamentaciones de seguridad locales y estatales ya que éstas pueden variar de las federales. Las instituciones que se encuentren fuera de Estados Unidos deben seguir las recomendaciones vigentes en su país para eliminar el material peligroso.



- Almacenar el kit Xpert HemosIL Factor II & Factor V a 2-28 °C.
- No abrir la tapa del cartucho hasta el momento de procesar el test.
- En el caso en que la presión interna sobrepase los límites establecidos por el fabricante, el proceso se abortará de forma automática y se informará un resultado de ERROR.
- Las fichas de información referentes a la seguridad del material (MSDS, Material Safety Data Sheet) para todos los reactivos del kit están disponibles según petición en las páginas Web siguientes www.Cepheid.com, www.cepheidinternational.com o directamente al soporte técnico de Cepheid.
- La Albúmina Sérica Bovina (BSA) de este producto fue exclusivamente obtenida de plasma bovino original procedente de Estados Unidos. La fabricación de la BSA fue también realizada en Estados Unidos. Los animales no fueron alimentados ni con proteínas de rumiante ni con otras proteínas animales; los animales pasaron un chequeo antes y después de su muerte. Durante dicho proceso no hubo contacto del material con ningún otro material animal.

Obtención y Almacenamiento de la Muestra



Para obtener la muestra adecuadamente, seguir atentamente las instrucciones de esta sección.

1. Solamente personal autorizado y formado deberían extraer sangre utilizando tubos con anticoagulante EDTA o citrato sódico.
2. No centrifugar o concentrar la muestra de sangre extrayendo plasma.
3. La sangre debería procesarse durante las 24 horas posteriores a la extracción si se guarda a temperatura ambiente (22-28 °C). Las muestras deben ser almacenadas a 2-8 °C si se guardan más de 24 horas. La sangre se mantiene estable durante 15 días si se almacena a 2-8 °C. Las muestras de sangre pueden también guardarse hasta 3 meses a -20 °C o -80 °C. Se recomienda el uso de un vial de almacenamiento compatible con la congelación.

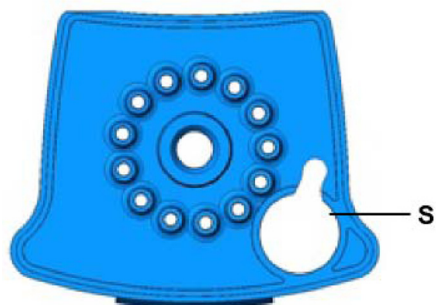
Descongelar completamente la sangre a temperatura ambiente. No se recomienda congelar y descongelar la sangre más de 1 vez.

4. Homogeneizar la muestra por inversión 5 veces antes de dispensarla en el cartucho.

Procedimiento

Preparación del cartucho

Important: Empezar el test antes de que transcurran 15 minutos después de dispensar la muestra en el cartucho.



S= Muestra

Figure 1. Cartucho de Xpert HemosIL Factor II & Factor V (visto desde arriba)

Para dispensar la muestra en el cartucho:

1. Sacar el cartucho del kit.
2. No es necesario mantener el cartucho a temperatura ambiente antes de usarlo.
3. Mezclar la muestra por inversión del tubo múltiples veces hasta homogenizarla.
4. Abrir la tapa del cartucho. Utilizando una pipeta con puntas de filtro, dispensar 50 µL de sangre total anticoagulada con citrato o EDTA en la pared del fondo del compartimento “S” del cartucho Xpert HemosIL Factor II & Factor V.
5. Cerrar la tapa del cartucho.

Iniciar el Test

Important: Antes de iniciar el test, asegúrese de que los archivos correspondientes a la definición de los tests Xpert HemosIL FII, XpertHemosIL FV y XpertHemosIL FII & FV Combo se encuentran en el software. Los archivos con la definición de los tests están en el CD suministrado en el kit.

Esta sección describe los pasos principales para realizar el test. Para instrucciones más detalladas, consultar el *Manual del Operador del Sistema GeneXpert Dx*.

1. Encender primero el instrumento GeneXpert Dx y luego el ordenador; el software GeneXpert se iniciará automáticamente.
2. Entrar en el software del GeneXpert Dx utilizando el nombre y la contraseña.
3. Pulsar sobre **Create Test** de la ventana GeneXpert Dx System. Se abre la ventana Create Test.
4. Leer con el escáner el código de barras del cartucho.
5. En la casilla Sample ID, teclear la identificación de la muestra. Asegúrese de teclear correctamente la ID de la muestra. También se puede escanear el código de barras de la muestra del paciente. La ID de la muestra se asocia al resultado del test y aparece en la pantalla **View Results** y en todos los informes.

Name	Version
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FV	1
Xpert HemosIL FII & FV Combo	1

Figure 2. Ventana de creación del test

6. Desde el menú desplegable **Select Assay** (Seleccionar ensayo), seleccione el ensayo que se quiere realizar.
7. Haga clic en **Start Test** (Iniciar prueba). En el cuadro de dialogo que aparece, escriba su contraseña.
8. Abrir la puerta del módulo del instrumento que tenga la luz verde parpadeando sobre la puerta y colocar el cartucho.
9. Cerrar la puerta. El test empieza a procesarse y la luz verde deja de parpadear, manteniéndose encendida. Cuando el ensayo haya finalizado dicha luz se apagará.
10. Una vez finalizado el test, la puerta del módulo se desbloqueará. Abrir la puerta del módulo y sacar el cartucho.

11. Deshacerse del cartucho utilizado en un depositándolo en un contenedor adecuado de residuos siguiendo las prácticas estandarizadas de su institución.

Visualización e impresión de resultados

Para información detallada de cómo se consultan y se imprimen los resultados, referirse al *Manual del Operador del Sistema GeneXpert Dx*.

CONTROL Control de Calidad

En cada ensayo se realiza un chequeo de la sondas (PPC).

Probe check control (PCC)—Antes de empezar la reacción PCR, el sistema GeneXpert Dx mide la señal fluorescente de las sondas con el fin de comprobar la correcta rehidratación de los reactivos, el llenado de los tubos de reacción, la integridad de las sondas y la estabilidad de la señal de la misma. El control del chequeo de las sondas es satisfactorio cuando todos los parámetros se encuentran dentro de los criterios establecidos.

Controles Externos—FII & FV DNA Control PN 0020003500 se ha diseñado y validado para el programa de QC Externo del Ensayo Xpert HemosIL FII & FV.

Como alternativa, pueden utilizarse muestras de sangre total (con citrato sódico o EDTA como anticoagulante) de Factor II/Factor V normal, heterocigoto u homocigoto, en la formación de usuarios, las pruebas de validación y el QC externo del ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V. Se requiere material basado en células. No utilizar ADN extraído. Los controles externos se pueden utilizar de acuerdo con las organizaciones acreditadas locales, estatales o federales, según sea el caso.

Interpretación de resultados

Los resultados son interpretados por el sistema GeneXpert Dx a partir de las señales fluorescentes medidas, las cuales se procesan por unos algoritmos de cálculo con el fin de identificar los genotipos. Y éstos se pueden consultar en las siguientes ventanas de Visualización de Resultados.

Para los resultados del test Xpert HemosIL FII (figuras de la 3 a la 5).

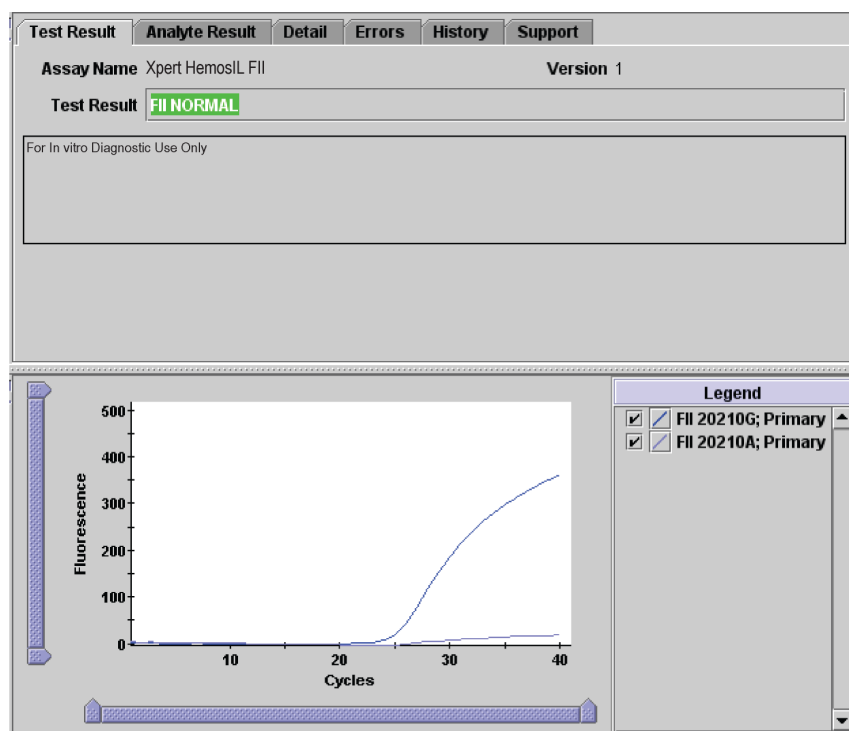


Figure 3. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de Factor II Normal

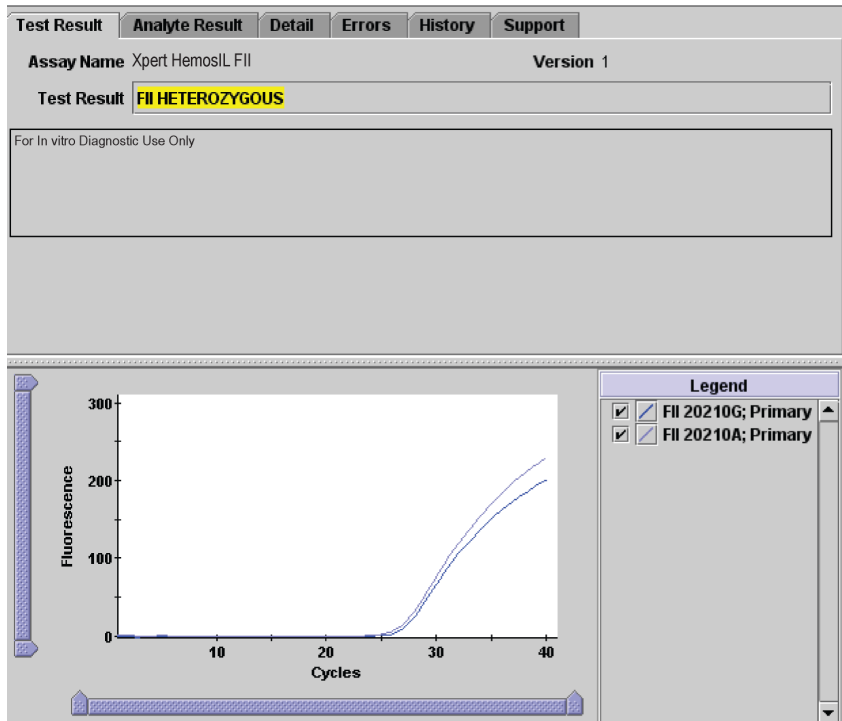


Figure 4. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de Factor II Heterozigoto

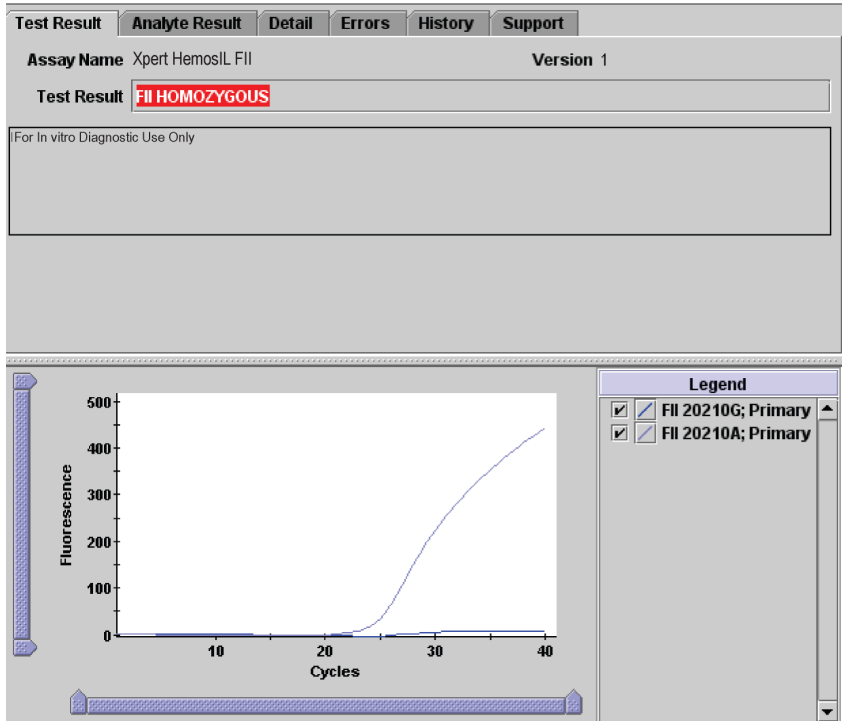


Figure 5. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de Factor II Homozigoto

Para los resultados del test Xpert HemosIL FV (figuras de la 6 a la 8).

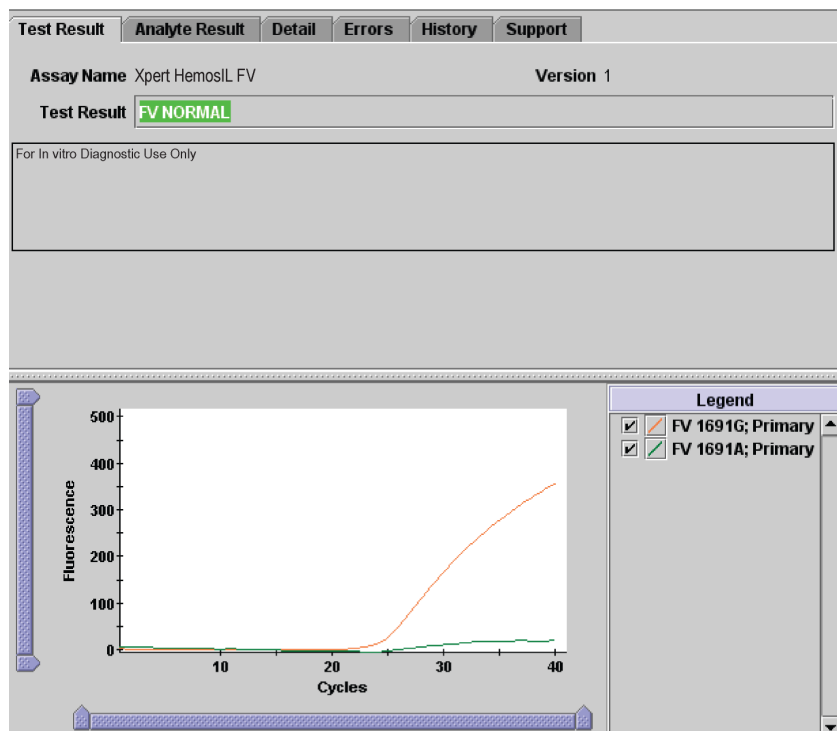


Figure 6. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de Factor V Normal

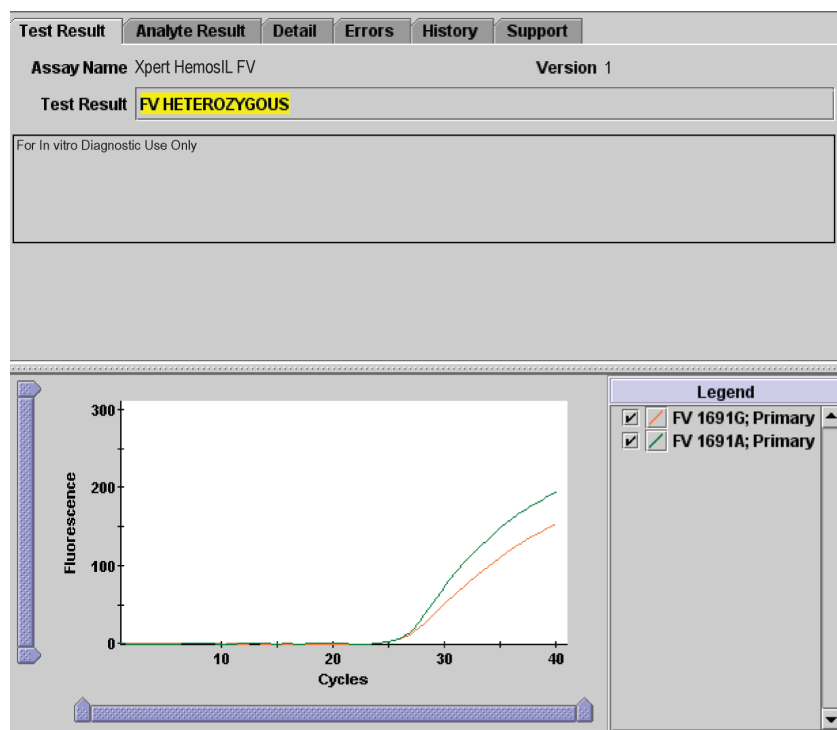


Figure 7. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de Factor V Heterozigoto

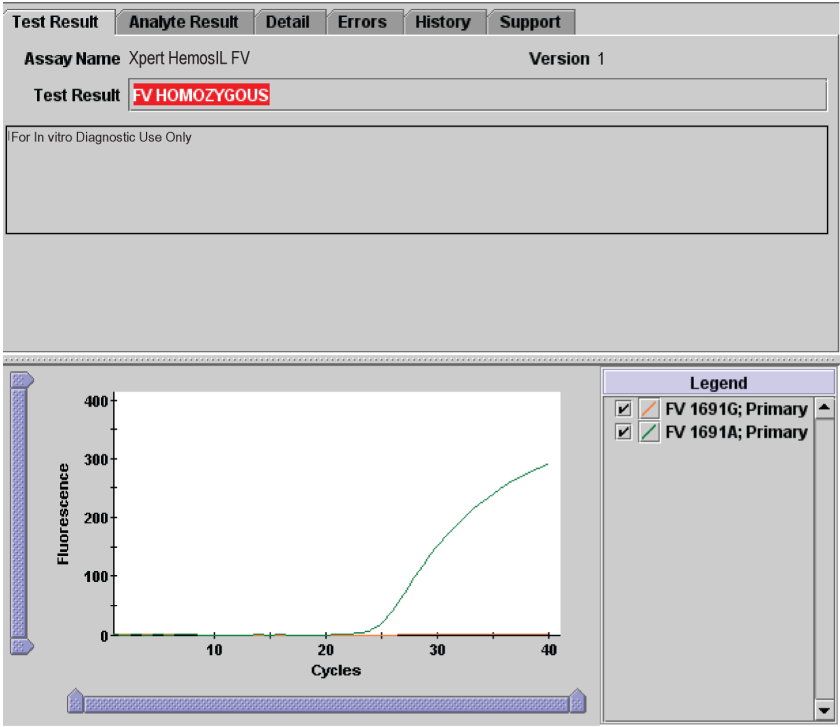


Figure 8. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de Factor V Homozigoto

Para los resultados del test Xpert HemosIL FII & FV Combo (figuras de la 9 a la 11).

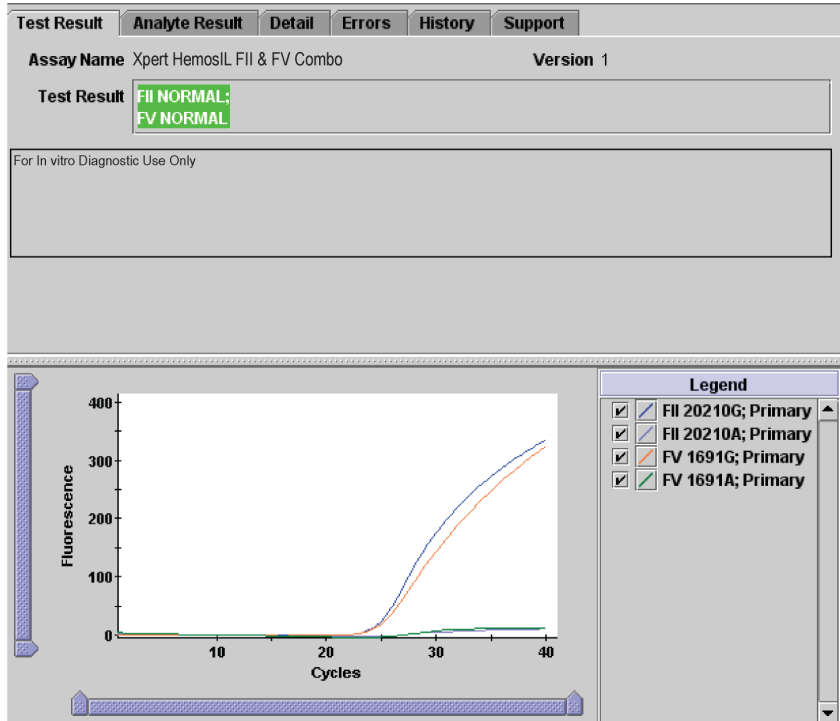


Figure 9. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de FII & FV Normal

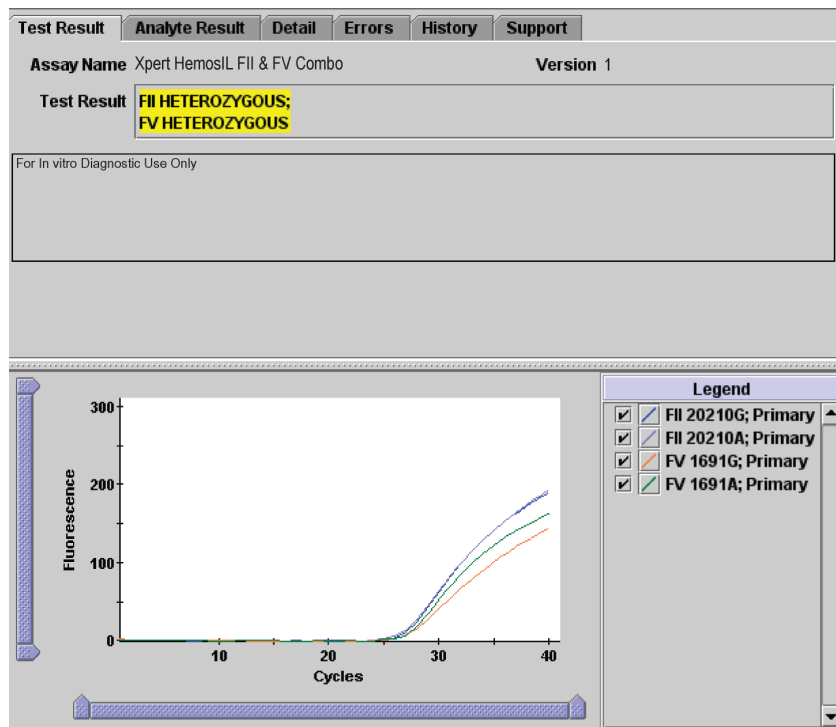


Figure 10. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de FII & FV Heterozigoto

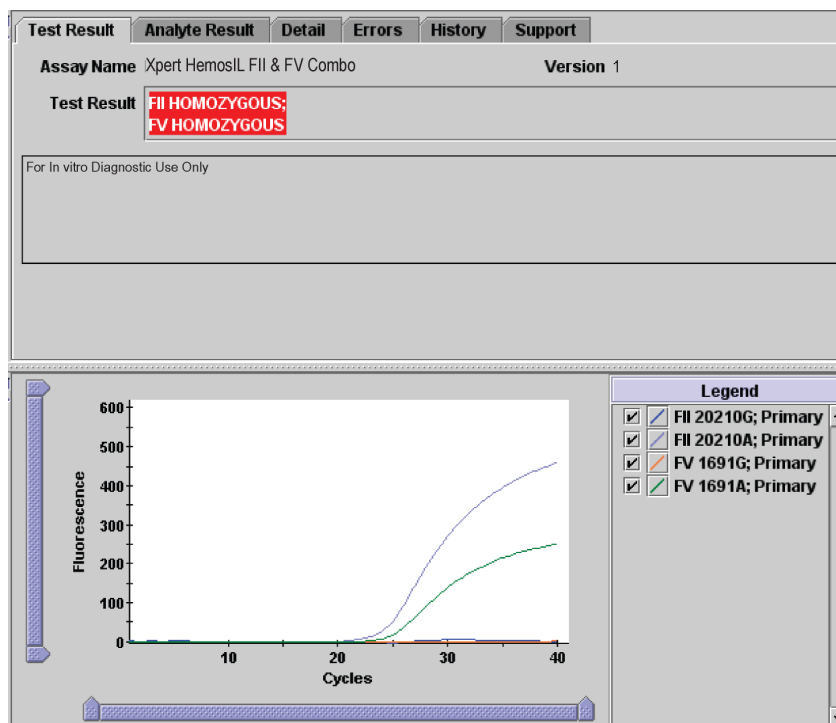


Figure 11. Sistema Genexpert Dx – Ventana de Visualización de Resultados, Resultado de FII & FV Homozigoto

NO VÁLIDO

Si la presencia o ausencia de los alelos normales y mutados del Factor II/Factor V no se puede determinar, repetir el ensayo. La muestra no fue procesada correctamente o se produjo una inhibición de la PCR.

- NO VÁLIDO—La presencia o ausencia de los alelos Factor II/Factor V no se pueden determinar.
- Probe Check (Chequeo de la sonda)—PASS; el resultado del chequeo de todas las sondas está en rango.

ERROR

Si la presencia o ausencia de los alelos normales y mutantes de Factor II/Factor V no se puede determinar, repetir el ensayo siguiendo las instrucciones que se muestran más abajo. El chequeo de las sondas no ha sido satisfactorio y posiblemente la sesión se ha abortado debido posiblemente al incorrecto llenado de los tubos de reacción, o a la detección de un problema con la integridad de la sonda. También se pueden producir errores debido a que se hayan superado los límites de presión máxima o al fallo de algún componente del sistema.

- ERROR
- Probe Check (Chequeo de la sonda)—FAIL*; Ha fallado el chequeo de una o más sondas.

* Si la sonda ha superado los resultados del chequeo, el error está causado por un fallo de un componente del sistema.

NO RESULTADO

Si la presencia o ausencia de los alelos normales y mutantes de Factor II/Factor V no se puede determinar, repetir el ensayo siguiendo las instrucciones que se muestran más abajo. Se han obtenido datos insuficientes para calcular los resultados de un test (por ejemplo, esto puede suceder si el operador detiene un test que se estaba procesando).

- NO RESULTADO
- Probe Check (Chequeo de la sonda): NA (No Aplica).

MOTIVOS PARA REPETIR UN ENSAYO

Repetir el test usando un cartucho nuevo (no reutilizar un cartucho), reactivos líquidos 1 y 2 nuevos y una nueva alícuota de sangre total anticoagulada con citrato o EDTA en los siguientes casos:

- Un resultado NO VÁLIDO indica que la muestra no fue procesada adecuadamente o bien se produjo una inhibición de la PCR.
- Un resultado ERROR indica que el chequeo de las sondas no ha sido satisfactorio y que el ensayo fue abortado posiblemente debido al incorrecto llenado de los tubos de reacción o a un problema en la integridad de la sonda. Los errores pueden también ser producidos debido a que se han superado los límites de presión máxima o a un fallo en algún componente del sistema.
- Un NO RESULTADO indica que se han obtenido datos insuficientes para calcular los resultados del test. Por ejemplo, el operador paró un test que se estaba procesando.

Limitaciones

- Las especificaciones del ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V fueron validadas siguiendo el procedimiento descrito en su ficha técnica. Modificaciones en este procedimiento pueden alterar la funcionalidad de dicho test. Los resultados del Ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V deben interpretarse en combinación con otros datos clínicos y de laboratorio disponibles para el clínico.
- Mutaciones raras del Factor V (A1696G, G1689A y A1692C) y cualquier SNP adicional en la región de unión de la sonda pueden interferir con la detección objetivo y dar resultados NO VÁLIDOS.

Sustancias Interferentes

Pacientes que estén bajo terapia con heparina o pacientes que se hayan sometido a una transfusión de sangre pueden tener sustancias en la sangre que interfieran potencialmente con los resultados de la PCR y den lugar a resultados no válidos o erróneos.

Estudios de sustancias potencialmente interferentes mostraron que no había inhibición hasta 14.3 unidades USP/mL de heparina, 16 mg/dL de bilirrubina, 250 mg/dL de colesterol, 1932 mg/dL de triglicéridos totales (lípidos). No se observó inhibición al utilizar muestras de sangre total sometidas a un ciclo de congelación-descongelación (sangre hemolizada). No hubo diferencias estadísticamente significativas entre muestras con EDTA o con citrato sódico.

Valores Esperados

Las mutaciones para el Factor II (G20210A) y para el Factor V Leiden (G1691A) están presentes en el 2% y 5% respectivamente de la población general.⁷

Especificaciones del ensayo

Evaluación clínica

Se evaluaron las especificaciones técnicas del test Xpert HemosIL Factor II & Factor V en un estudio de investigación multicéntrico, en el que siete centros compararon el test Xpert HemosIL Factor II & Factor V con la secuenciación bidireccional.

Las muestras incluidas fueron las obtenidas para realizar por rutina la determinación del Factor II y del Factor V en sangre total. En primer lugar, las muestras se procesaron por los métodos de rutina usados en el laboratorio participante. A continuación, las muestras se alicuotaron y se realizó el test Xpert HemosIL Factor II & Factor V en el GeneXpert. El DNA en exceso se enviaba a un laboratorio contratado para que realizaran la secuenciación bidireccional.

La evaluación del Ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V se hizo en relación a los resultados de la secuenciación bidireccional.

Resultados Globales

Ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Se procesaron un total de 1018 muestras para Factor II tanto por el método Xpert HemosIL Factor II & Factor V como por secuenciación bidireccional. Un total de 1014 se procesaron para el Factor V tanto por el método Xpert HemosIL Factor II & Factor V como por secuenciación bidireccional. Además, para aumentar la cantidad de muestras homocigotas, se procesaron también 6 muestras humanas homocigotas para Factor II y cinco homocigotas para Factor V, tanto por el método Xpert HemosIL Factor II & Factor V como por la secuenciación bidireccional. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

El ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V presentó una exactitud global relativa del 99,3% en relación a la secuenciación bidireccional para Factor II y Factor V.

Tableau 1. Evaluación de Xpert HemosIL Factor II & Factor V vs. Secuenciación Bidireccional

Genotipo	Número Analizado	Número de Resultados correctos en la primera sesión	Número de Resultados no válidos ^a en la primera sesión	Concordancia en la primera sesión	Número de resultados correctos, incluyendo los que se repitieron	Número de resultados no válidos ^a en repetición de sesiones	Concordancia después de repetir una sesión
Factor II G20210A							
WT ^d	968	927	41	95,8%	963	5	99,5%
HET	50	48	2	96,0%	48	2	96,0%
HOM	7	7	0	100,0%	7	0	100%
Global	1025 ^b	982	43	95,8%	1018	7	99,3%
Factor V G1961A							
WT	895	860	35	96,1%	889	6	99,3%
HET	114	108	6	94,7%	113	1	99,1%
HOM	12	11	1	91,7%	12	0	100,0%
Global	1021 ^c	979	42	95,9%	1014	7	99,3%

^a No hay discordancia en los resultados. Resultados no válidos referidos a resultados ?indeterminados?.

^b Resultados de secuenciación bidireccional para Factor II no disponibles para 4 muestras.

^c Resultados de secuenciación bidireccional para Factor V no disponibles para 8 muestras.

^d WT (wildtype) es normal.

Especificidad Analítica

Para evaluar la especificidad analítica del Ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V, se sintetizaron secuencias de genes normales que contenían polimorfismos de nucleótidos simples silentes (SNPs) en la región de unión a la sonda así como fuera de la región de

unión a la sonda. La presencia de SNP adicionales en la región de unión a la sonda, en la mayoría de los casos, dio lugar a resultados no válidos. Cuando se obtuvo un resultado válido, dio el genotipo correcto.

La presencia de SNP adicionales fuera de la región de unión a la sonda dio resultados con el genotipo correcto.

Sensibilidad Analítica

Se realizaron estudios para determinar la mínima y la máxima cantidad de muestra de sangre del paciente anticoagulada tanto con EDTA como con citrato sódico, necesaria para obtener un genotipo correcto, de manera que el límite inferior del intervalo de confianza del 95% para la fracción estimada “resultado correcto” fuera superior al 95%.

Las muestras de sangre total anticoagulada con EDTA y citrato sódico se procesaron (n=20) con 8 volúmenes que variaban desde 5 µL hasta 250 µL.

Aunque el ensayo puede tolerar variaciones de volumen de 15 µL-100 µL, se recomienda un volumen de muestra de 50 µL para minimizar el riesgo de errores asociados con el defecto y el exceso de la muestra.

Reproducibilidad

Un panel de 5 muestras, una de cada tipo de los mostrados a continuación, se procesaron por duplicado por dos usuarios distintos, en 5 días diferentes, en tres lugares diferentes (3 muestras x 2 veces/día x 2 usuarios por lugar x 5 días x 3 lugares). Se utilizó un lote del kit Xpert HemosIL Factor II & Factor V en los tres lugares diferentes. El ensayo Xpert HemosIL Factor II & Factor V se realizó siguiendo el procedimiento del Xpert HemosIL Factor II & Factor V. Los resultados están resumidos en las Tablas 2-5.

Panel del Estudio:

1. Una muestra con alelos normales (wildtype) tanto para el Factor II como para el Factor V.
2. Una muestra heterocigota para la mutación del Factor II (es decir, un alelo mutante y otro normal para el gen del Factor II) y alelos normales (wildtype) para el Factor V.
3. Una muestra homocigota para la mutación del Factor II (es decir, dos alelos mutantes para el gen del Factor II) y con alelos normales (wildtype) para el Factor V.
4. Una muestra con alelos normales (wildtype) para el Factor II y homocigoto para la mutación del Factor V (es decir, dos alelos mutantes para el gen del Factor V).
5. Una muestra con alelos normales (wildtype) para el Factor II y heterocigota para la mutación del Factor V (es decir, un alelo mutante y un alelo normal para el gen del Factor V).

En las Tablas 2 y 3 se muestra un resumen de los resultados según el lugar. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados según el lugar de análisis ni para el Factor II (p=1.000) ni para el Factor V (p=1.000).

Tableau 2. Resumen de Resultados de Reproducibilidad según el Lugar – Factor II

ID Muestra	Lugar 1	Lugar 2	Lugar 3	%Concordancia Total según la Muestra
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95,0% (19/20) ^a	98,3% (59/60) ^a
%Concordancia Total según el Lugar	100% (60/60)	100% (60/60)	98,3% (59/60) ^a	99,7% (299/300) ^a

^a Sin resultados discordantes. Una muestra no pudo determinarse después de volverse a procesar.

Tableau 3. Resumen de Resultados de Reproducibilidad según el Lugar – Factor V

ID Muestra	Lugar 1	Lugar 2	Lugar 3	%Concordancia Total según la Muestra
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95,0% (19/20) ^a	98,3% (59/60) ^a
%Concordancia Total según el Lugar	100% (60/60)	100% (60/60)	98,3% (59/60) ^a	99,7% (299/300) ^a

^a Sin resultados discordantes. Una muestra no pudo determinarse después de volverse a procesar.

En las Tablas 4 y 5 se muestra un resumen de los resultados según el usuario. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados según el usuario ni para el Factor II ($p=1.000$) ni para el Factor V ($p=1.000$).

Tableau 4. Resumen de Resultados de Reproducibilidad según Usuario – Factor II

ID Muestra	Lugar 1		Lugar 2		Lugar 3		%Concordancia Total según la Muestra
	Us. 1	Us. 2	Us. 1	Us. 2	Us. 1	Us. 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90,0% (9/10) ^a	98,3% (59/60) ^a
%Concordancia Total según el Usuario	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98,0% (49/50) ^a	99,7% (299/300) ^a

^a Sin resultados discordantes. Una muestra no pudo determinarse después de volverse a procesar.

Tableau 5. Resumen de Resultados de Reproducibilidad según Usuario – Factor V

ID Muestra	Lugar 1		Lugar 2		Lugar 3		%Concordancia Total según la Muestra
	Us. 1	Us. 2	Us. 1	Us. 2	Us. 1	Us. 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HET/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HOM/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90,0% (9/10) ^a	98,3% (59/60) ^a
%Concordancia Total según el Usuario	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98,0% (49/50) ^a	99,7% (299/300) ^a

^a Sin resultados discordantes. Una muestra no pudo determinarse después de volverse a procesar.

Para evaluar la reproducibilidad entre lotes, el panel de 5 muestras descrito anteriormente se analizó dos veces por día durante cinco días utilizando tres lotes de ensayo en cada lugar de análisis (5 muestras x 2 veces por día x 3 lotes x 5 días). En las tablas 6 y 7 se muestra un resumen de los resultados según el lote. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre los resultados según el lote ni para el Factor II ($p=1,000$) ni para el Factor V ($p=1,000$).

Tableau 6. Resumen de Resultados de Reproducibilidad según Lote – Factor II

ID Muestra	Lote 1	Lote 2	Lote 3	%Concordancia Total según la Muestra
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
%Concordancia Total según el Lote	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Tableau 7. Resumen de Resultados de Reproducibilidad según Lote – Factor V

ID Muestra	Lote 1	Lote 2	Lote 3	%Concordancia Total según la Muestra
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
%Concordancia Total según el Lote	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Referencias

1. Thrombophilia as a multigenic disease. B. Zoeller, P.G. de Frutos, A. Hillarp., B. Dahlback. Haematologica 1999; 84:59-70.
2. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. V. De Stefano, E. Rossi, K. Paciaroni, G. Leone. Haematologica 2002; 87:1095 – 1108.
3. Laboratory investigation of thrombophilia. A Tripodi and P.M. Mannucci. Clinical Chemistry 2001; 47:1597 – 1606
4. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Elaine B. Spector, Wayne W. Grody, Carla J. Matteson, , Glenn E. Palomaki, Daniel B. Bellissimo,, Daynna J. Wolff, Linda A. Bradley, , Thomas W. Prior, Gerald Feldman, Bradley W. Popovich, Michael S. Watson, and C. Sue Richards ACMG Standards and Guidelines July/August 2005, Vol. 7, No. 6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, et al. American college of medical genetic consensus statement on factor V leiden mutation testing. Genetics in Medicine. 2001;3(2):139-148.

Tabla de Símbolos

Tableau 8. Significado de los símbolos.

Símbolo	Significado
	Número de catálogo
	Dispositivo médico para uso diagnóstico <i>in vitro</i>
	No reutilizar
	Precaución, consultar el documento anexo
	Fabricante
	Contiene suficiente para <n> tests
	Control
	Marca CE – Conformidad europea
	Representante autorizado en la Comunidad Europea
	Límite de temperatura
	Peligro biológico

Fabricante

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Phone: +1.408.541.4191

Fax: +1.408.541.4192

Representante Autorizado

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00

Fax: +33.563.82.53.01

Distribuido exclusivamente por

 Instrumentation Laboratory



Italiano

Per uso diagnostico *in vitro*

Nome del Prodotto

Xpert® HemosIL® FII & FV

Nome Prodotto

Xpert HemosIL Fattore II & Fattore V Assay

Xpert HemosIL Fattore II & Fattore V

Utilizzo

Xpert HemosIL FII & FV è un test genetico qualitativo per la determinazione delle mutazioni del Fattore II (G20210A) e del Fattore V Leiden (1691G>A) su sangue intero con EDTA o con sodio citrato. Il test può essere eseguito solo sullo strumento GeneXpert® Dx System della Cepheid e contribuisce alla diagnosi in pazienti con sospetta trombofilia.

Introduzione

L'associazione delle mutazioni del Fattore II (G20210A) e del Fattore V Leiden (G1691A) incrementa il rischio di un evento tromboembolico come ben documentato in letteratura^{1, 2, 3, 4}. La mutazione del Fattore II riguarda una regione non trascritta in posizione 3' del gene attraverso la sostituzione di una G con una A ed è associato ad un incremento nel plasma del livello di protrombina. Il fattore V Leiden è anch'essa una mutazione puntiforme G>A del gene, ciò comporta una sostituzione aminoacidica Arginina in Glutammica nella proteina conferendone una resistenza alla Proteina C attivata (APC). FII(G20210A) e il FV Leiden sono mutazioni presenti rispettivamente nel 2% e 5% della popolazione.⁷

Principio del metodo

Il GeneXpert è un sistema completamente integrato che automatizza i tre processi necessari per eseguire una Real-Time PCR: preparazione del campione, amplificazione e rilevamento della sequenza target. Il sistema consiste di un modulo analitico e di un modulo di controllo costituito da un PC laptop o desktop, un lettore bar-code ed un software di gestione della procedura analitica. Il sistema richiede l'uso di una cartuccia che contiene i reagenti necessari per l'esecuzione della real-time PCR e rilevazione delle mutazioni del FV e del FII. Inoltre essendo un sistema chiuso si evitano qualsiasi forma di cross-contaminazione tra differenti campioni. Per ciascuna determinazione viene eseguito un "Probe Check Control" che verifica l'integrità delle sonde, la corretta reidratazione dei reagenti e la corretta ricostituzione dei compartimenti. Per una completa descrizione del sistema si prega di fare riferimento al *Manuale Operatore dello strumento*.

I primer e le probe nel kit Xpert HemosIL Fattore II & Fattore V Assay sono specifiche per la determinazione del genotipo del FII alla posizione 20210 e/o del FV alla posizione 1691

Composizione



Il kit contiene i reagenti sufficienti ad eseguire 10 determinazioni o controlli di qualità ed è composto da:

- 10 cartucce di HemosIL Fattore II & Fattore V con camere di processamento separate contenenti i seguenti reattivi in forma liofila
- In un compartimento ci sono in forma liofila i seguenti reattivi:
 - Polimerasi
 - dNTPs
 - Albumina Bovina (BSA)
- In un compartimento ci sono in forma liofila i seguenti reattivi:
 - Primers
 - Probes
 - BSA
- Reagente 1 (Tris buffer, EDTA, Tween 20) (TET), 3,0 mL per cartuccia
- Reagente 2 (Tris Buffer, GHCl, Sarkosyl, Tween° 20) (GHCl), 3,0 mL per cartuccia
- CD contenente:
 - File di definizione del Test (ADF)
 - Istruzione di come importare il protocollo nel GX Software
 - Inserto

Conservazione e Stabilità dei reagenti



- Mantenere le cartucce e i reagenti ad una temperatura compresa tra 2-28 °C
- Non usare le cartucce fuori dalla data di scadenza
- Non aprire la cartuccia fino al momento di eseguire il test
- Usare la cartuccia entro 30 minuti dall'apertura del coperchio



Reagenti Ausiliari

I seguenti prodotti non sono forniti insieme al kit e devono essere ordinati separatamente:

- Strumento GeneXpert, computer, barcode scanner e manuale operatore dello Strumento.

Note: Lo strumento presenta diverse configurazioni possibili contattare la Cepheid per quella più adatta alle esigenze del proprio laboratorio.

- Controlli di qualità esterni: Possono essere utilizzati campioni di sangue (citrati o con EDTA) sia normali che patologici.
- GeneXpert Dx Software versione 4.0 o superiori.
- Pipette per dispensare i 50 µL di sangue con puntali contenenti un filtro.
- HemosIL FII & FV DNA Control, PN 0020003500.

Avvertenze e precauzioni



- Nocivo per ingestione (R22), Irritante per gli occhi e la pelle (R36/38).
- Tutti i prodotti devono essere trattati come potenzialmente infetti. Fare riferimento alle linee guida rilasciate e disponibili presso l'U.S Center for Disease Control and Prevention⁵ and the Clinical and Laboratory Standards Institute (ex National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁶
- Seguire attentamente le procedure di sicurezza per la manipolazione dei campioni biologici e sostanze chimiche.
- Usare le cartucce entro la data di scadenza riportata sul kit.
- Aprire il coperchio della cartuccia Xpert HemosIL Fattore II & Fattore V solo per aggiungere il campione.
- Non usare una cartuccia che sia accidentalmente caduta o che sia stata agitata dopo l'aggiunta del campione.
- Non usare la cartuccia se danneggiata.
- Ogni cartuccia esegue un solo test. Non riutilizzare.



- Consultare il personale addetto alla gestione dei rifiuti per il corretto smaltimento delle cartucce e dei reagenti inutilizzati. Questo materiale richiede una procedura specifica di smaltimento secondo le normative EPA Resource Conservation and Recovery Act (RCRA). Verificare le norme statali e locali in quanto potrebbero differire dalle disposizioni federali sopracitate. Istituzioni al di fuori degli USA devono controllare le norme locali per lo smaltimento dei rifiuti pericolosi.
- Conservare il kit Xpert HemosIL FII & FV a 2-28°C.
- Aprire il coperchio della cartuccia solo prima di eseguire il test.
- Nel caso di aumenti di pressione interna al di sopra del limite prestabilito dal produttore, la corsa si interrompe automaticamente e verrà segnalato un risultato di errore.
- Le schede di sicurezza per tutti i reagenti possono essere richiesti al supporto tecnico della Cepheid e presenti sul suo sito ufficiale. (www.cepheid.com o www.cepheidinternational.com)
- L'albumina di siero bovino (BSA) è prodotta da plasma di derivazione bovina negli Stati Uniti. Gli animali hanno superato tutti i test ante e post mortem a conferma di non essere stati alimentati con proteine animali.



Preparazione dei Campioni e Conservazione



Seguire le seguenti istruzioni per la raccolta dei campioni:

1. Utilizzare solo sangue intero raccolto in EDTA o Sodio Citrato.
2. Non centrifugare o concentrare il sangue
3. I campioni conservati a 15-30 °C devono essere analizzati entro 24 ore. Se conservati a 2-8 °C possono essere analizzati oltre le 24 ore. Il sangue è stabile per 15 giorni a 2-8 °C. I campioni possono essere conservati a -20 °C e -80 °C fino a 3 mesi.

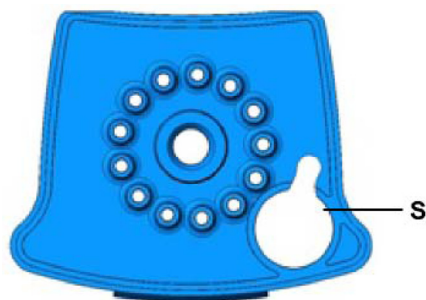
Lasciare scongelare il campione di sangue a temperatura ambiente. Evitare di congelare e congelare per più di due volte.

4. Invertire il campione per 5 volte prima di dispensarlo nella cartuccia.

Procedura

Preparazione della Cartuccia

Important: Avviare il test entro 15 minuti dall'aggiunta del campione alla cartuccia.



S = Campione

Figure 1. Xpert HemosIL FII & FV cartuccia vista dall'alto

Per aggiungere il campione alla cartuccia:

1. Rimuovere la cartuccia dalla confezione.
2. Non è necessario mantenere la cartuccia a temperatura ambiente prima dell'uso.
3. Miscelare il campione in modo da renderlo più omogeneo.
4. Aprire la cartuccia e trasferire nel compartimento indicato con la lettera "S" 50 µL di sangue intero utilizzando una pipetta con puntali provvisti di filtro.
5. Chiudere la cartuccia.

Procedura Analitica

Important: Prima di iniziare l'analisi verificare che nel software siano stati inseriti i protocolli di definizione dei test Xpert HemosIL FII, Xpert HemosIL FV e Xpert HemosIL FII & FV Combo. I protocolli sono presenti nel CD all'interno di ciascun Kit.

La seguente lista riporta le procedure da eseguire per avviare l'analisi:

1. Accendere lo strumento GeneXpert Dx e successivamente il PC; il software GeneXpert si avvia automaticamente.
2. Inserire la login e password qualora fosse stata configurata.
3. Cliccare sulla barra di navigazione **Create Test**.
4. Leggere con lo scanner il barcode riportato sull'etichetta della cartuccia.
5. Inserire l'identificativo del Campione (accertarsi di inserire il corretto identificativo). È possibile far leggere l'ID campione con il lettore barcone.

Name	Version
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FII	1
Xpert HemosIL FV	1
Xpert HemosIL FII & FV Combo	1

Figure 2. Schermata "Crea nuovo test"

6. Selezionare dal menù a tendina **Select Assay** (Seleziona saggio) il test da eseguire.
7. Fare clic su **Start Test** (Avvia analisi); nella finestra di dialogo visualizzata, digitare la password.
8. Inserire la cartuccia nella posizione libera disponibile identificabile da una luce verde intermittente posta in corrispondenza del modulo.
9. Chiudere lo sportellino. La luce passerà da un verde intermittente a fisso. Quando sarà finita l'analisi la luce si spegnerà.
10. A fine analisi lo sportellino si apre e si può rimuovere la cartuccia.
11. Gettare la cartuccia utilizzata negli appositi contenitori.

Visualizzazione e stampa dei risultati

Per istruzioni su come visualizzare e stampare i risultati, vedere il *Manuale dell'operatore di GeneXpert Dx System*.

CONTROL

Controllo di Qualità

Ogni analisi esegue un "probe check control" (PCC)

Probe check control (PCC)—Prima di effettuare l'analisi lo strumento effettua un controllo della fluorescenza emessa dalla sonda dopo reidratazione. Tale controllo verifica l'integrità della stessa.

Controlli Esterni—Il Kit HemosIL FII & FV DNA Control PN 0020003500 è stato progettato e validato come Controllo di Qualità Esterno per il test Xpert HemosIL FII & FV.

In alternativa, può essere utilizzato un campione di sangue intero Fattore II/Fattore V normale, eterozigote o omozigote (in sodio citrato o EDTA) per l'addestramento, il test di rendimento e come Controllo di Qualità Esterno per il test Xpert HemosIL FII & FV. È richiesto l'uso di materiale cellulare. Non usare DNA estratto. Controlli di Qualità Esterni dovrebbero essere usati in accordo con le organizzazioni locali.

Interpretazione dei Risultati

I risultati sono interpolati dalla misura della fluorescenza emessa dalle sonde e attraverso degli algoritmi viene identificato e segnalato a video nella schermata di visualizzazione dei risultati:

Per i risultati del test Xpert HemosIL FII (figure 3, 4 e 5).

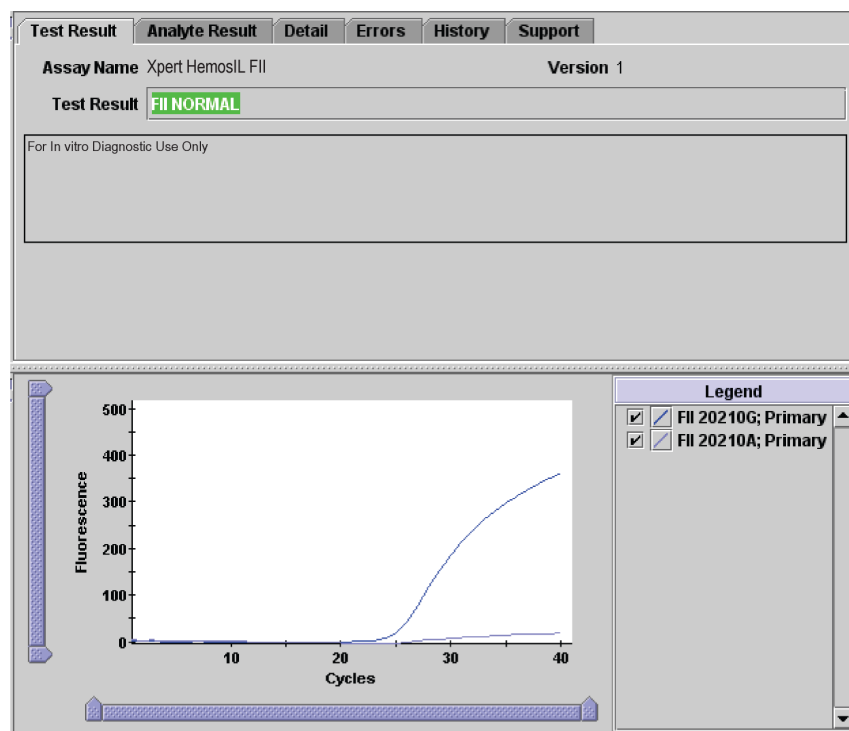


Figure 3. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione normale per il Fattore II

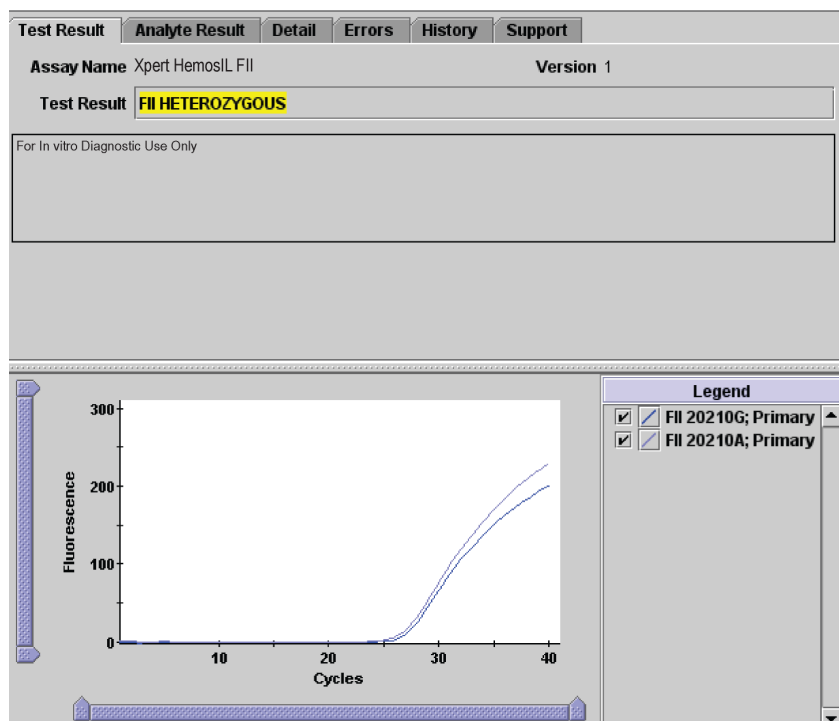


Figure 4. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione mutato eterozigote per il Fattore II

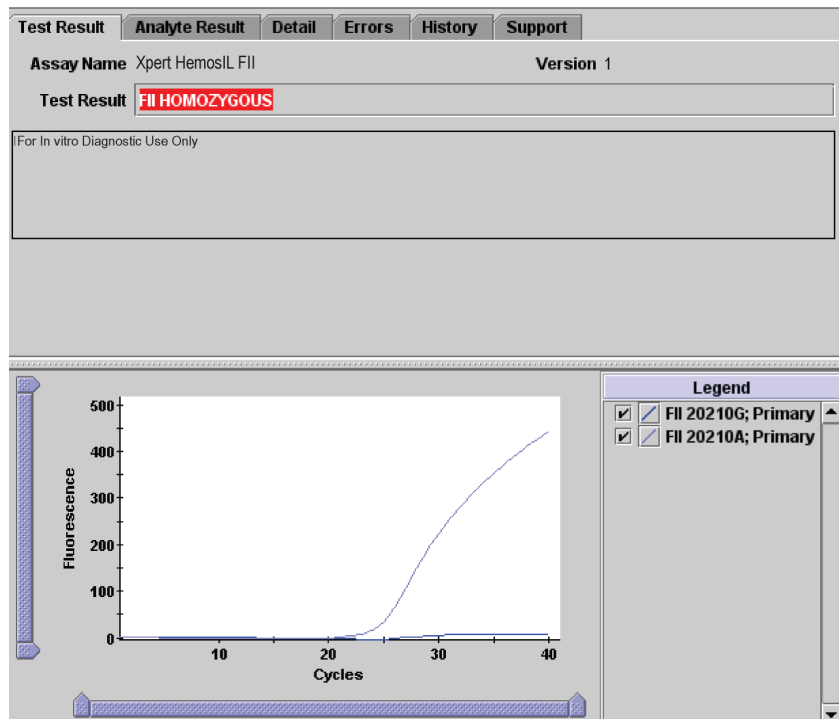


Figure 5. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione mutato omozigote per il Fattore II

Per i risultati del test Xpert HemosIL FV (figure 6, 7 e 8).

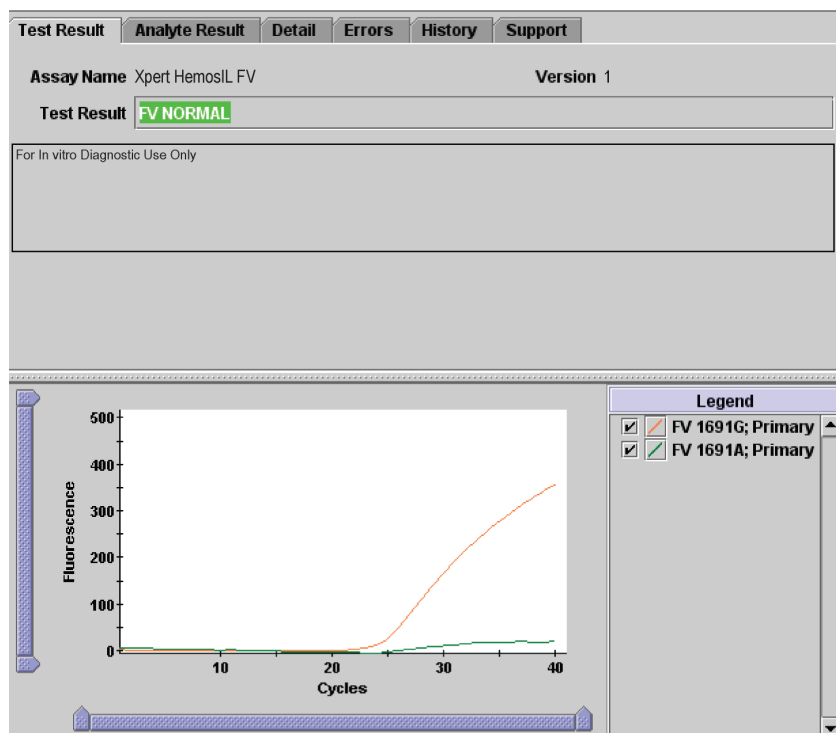


Figure 6. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione normale per il Fattore V

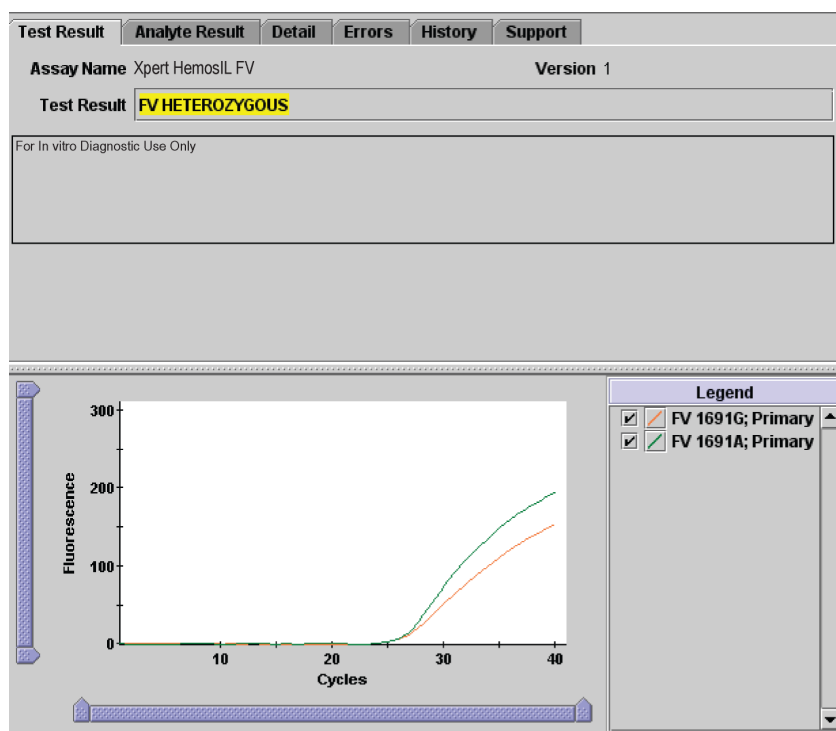


Figure 7. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione mutato eterozigote per il Fattore V

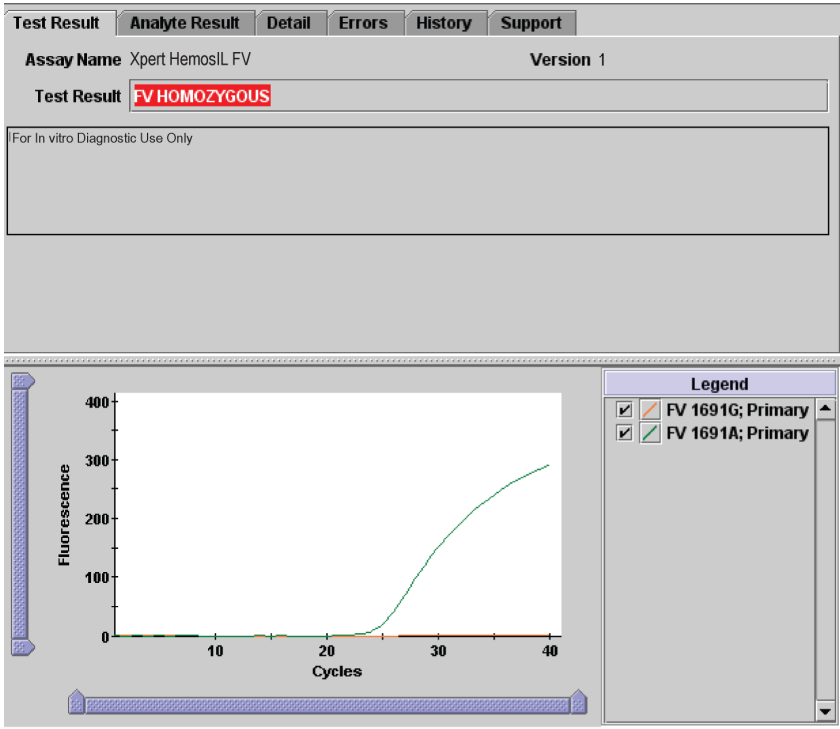


Figure 8. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione mutato omozigote per il Fattore V

Per i risultati del test Xpert HemosIL FII & FV Combo (figure 9, 10 e 11).

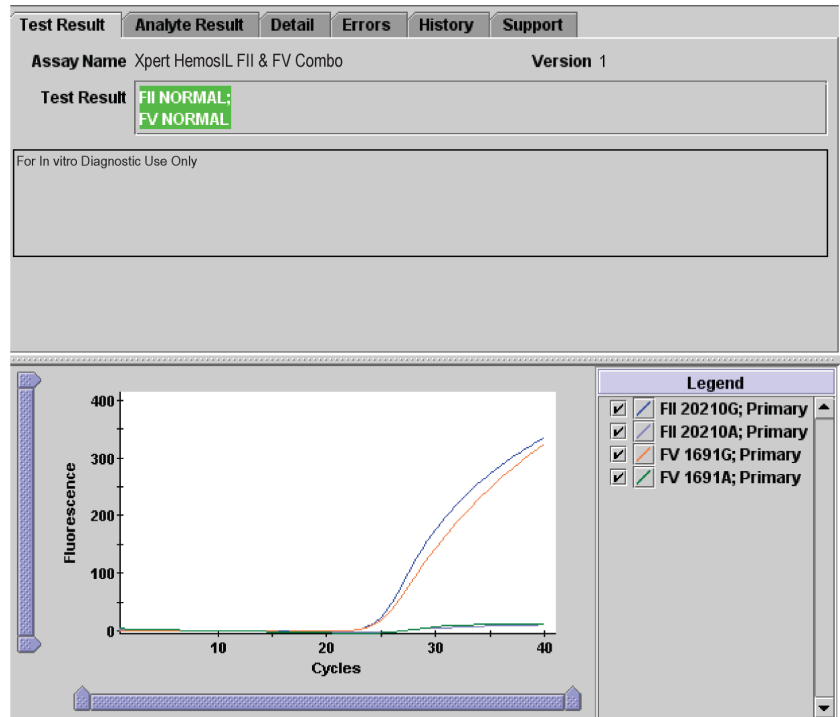


Figure 9. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione normale per entrambi i geni

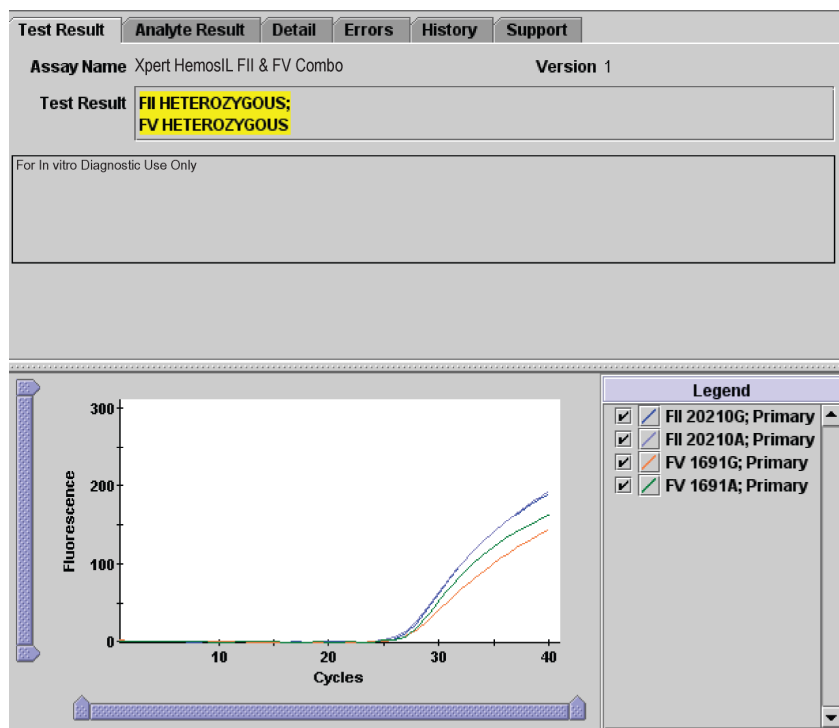


Figure 10. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione mutato eterozigote per entrambi i geni.

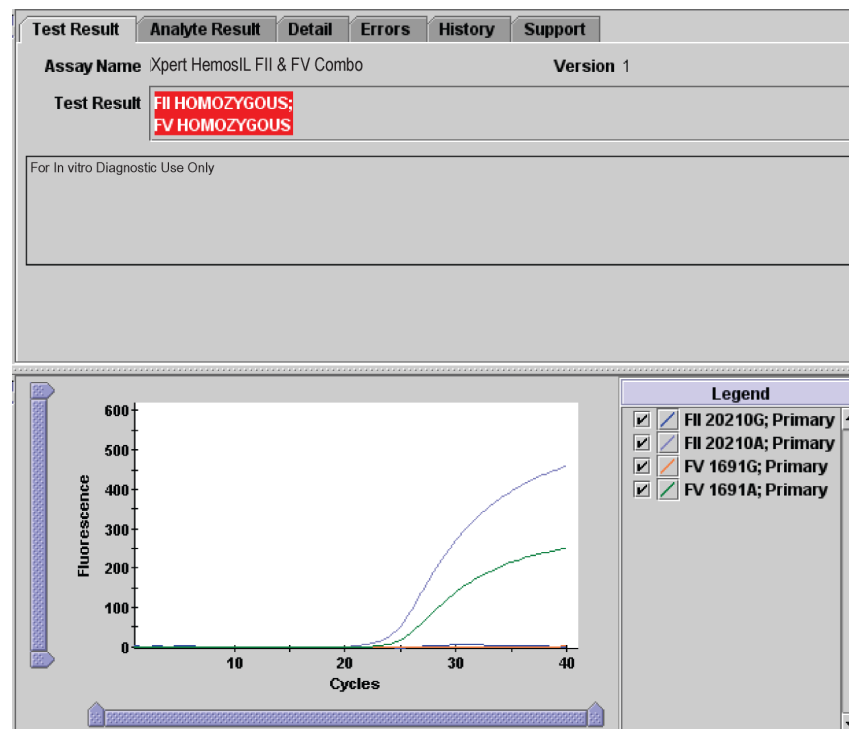


Figure 11. GeneXpert System – Visualizzazione dei risultati – Campione mutato omozigote per entrambi i geni.

Invalidi

Se non viene rilevata nessuna amplificazione del Fattore II & Fattore V, ripetere il test. I motivi possono essere dovuti a un processamento errato del campione o a una inibizione della PCR.

- INVALID—Incapacità di rilevare la presenza di uno o entrambi gli alleli di entrambi i geni.
- Probe Check—PASS; tutte le sonde hanno superato il controllo.

ERRORI

Se non viene rilevata nessuna amplificazione del Fattore II & Fattore V, ripetere il test. Il fallimento del “Probe Check Control” è dovuto a un’incorretta ricostituzione dei reagenti, problemi sull’integrità della sonda o il superamento del limite superiore di pressione.

- ERROR
- Probe Check—FAIL* (Fallito); tutte o una sola probe non ha superato il controllo.

*Se si supera il Probe Check ma viene segnalato un errore può essere dovuto ad un componente del sistema.

Nessun Risultato

Si verifica quando non ci sono dati sufficienti per produrre un risultato per esempio se l’operatore ha stoppato un esercizio in corso.

- NO RESULT
- Probe Check—NA (non applicabile)

Ripetizione del Test

Ripetere il test qualora si verificano le seguenti condizioni:

- “INVALID”: si verifica se il campione non è stato correttamente processato o che la PCR è stata inibita.
- “ERROR”: Errore dovuto al non superamento del “Probe Check Control” dovuta alla non corretta ricostituzione dei reagenti o alle sonde non integre. L’errore può verificarsi se viene superato il limite superiore di pressione interna o se un componente hardware presenta qualche problema.
- “NO RESULT”: Insufficienti dati per produrre un risultato dovuto per esempio ad interruzione del processo analitico da parte dell’operatore.

Limitazioni

- le performance del test Xpert HemosIL FII & FV sono state validate utilizzando la procedura descritta nell’inserito. Modifiche della procedura potrebbero alterare le performance del test.
- Rare mutazioni del FV (A1696G, G1689A e A1692G) e altre SNPs potrebbero interferire con la corretta sequenza target e dare un risultato “INVALIDO”

Sostanze interferenti

- Eseguire il test utilizzando campioni di sangue con EDTA o sodio citrato. L’utilizzo di campioni eparinati inibiscono la PCR.
- Studi di sostanze potenzialmente interferenti non ha mostrato alcuna inibizione fino a 3 unità USP / mL di eparina, 16 mg / dL bilirubina, 250 mg / dL colesterolo aggiunto, o 1932 mg / dL trigliceridi totali (lipidi). Alcuni inibizione è stata osservata usando campioni di sangue intero, che era passato attraverso un ciclo di congelamento-decongelamento (sangue emolizzato).
- Non significatività statistica è stata osservata per campioni raccolti o in EDTA o Sodio Citrato

Valori Attesi

Le mutazioni del fattore II (G20210A) e del fattore V (G1691A) sono presenti nella popolazione generale rispettivamente per il 2% e il 5%.⁷

Prestazioni

Le performance del kit Xpert HemosIL FII&FV sono state valutate in uno studio multicentrico comparandolo al sequenziamento bidirezionale.

In tale studio i campioni erano dapprima valutati con il metodo in uso presso ciascun laboratorio, poi testati con il kit Xpert HemosIL FII&FV, il DNA successivamente inviato ad un laboratorio di riferimento per il sequenziamento bidirezionale.

Risultati complessivi

Un totale di 1.018 campioni sono stati testati per il Fattore II sia dal Xpert HemosIL FII&FV che dal sequenziamento bidirezionale. Un totale di 1.014 campioni sono stati testati per il fattore V sia dal Xpert HemosIL FII&FV che dal sequenziamento bidirezionale. Per

integrare campioni omozigoti sono stati testati anche sei campioni con entrambe le mutazioni sia con il kit Xpert HemosIL FII&FV sia con il sequenziamento bidirezionale. I risultati sono riportati nella tabella 1.

Il fattore di Xpert HemosIL II e Fattore V analisi ha dimostrato un livello di precisione 99,3% complessivo rispetto al bi-direzionale per il sequenziamento, sia Fattore II e Fattore V.

Tableau 1. Xpert HemosIL Performance vs Sequenziamento bidirezionale

Genotipo	Testati	Corretti al primo run	Invalidi dopo il primo run ^a	Concordanza al primo run	Numero di risultati corretti dopo riesecuzione del Test	Invalidi su run ripetuti	Concordanza dopo aver rieseguito il Test
Fattore II G20210A							
WT ^d	968	927	41	95.8%	963	5	99.5%
ETERO	50	48	2	96.0%	48	2	96.0%
OMO	7	7	0	100.0%	7	0	100%
Overall	1025 ^b	982	43	95.8%	1018	7	99.3%
Fattore V G1691A							
WT	895	860	35	96.1%	889	6	99.3%
ETERO	114	108	6	94.7%	113	1	99.1%
OMO	12	11	1	91.7%	12	0	100.0%
Overall	1021 ^c	979	42	95.9%	1014	7	99.3%

^a Nessun risultato discordante. Il risultato "Invalido" si riferisce ad un risultato indeterminate.

^b Per il sequenziamento bi-direzionale I risultato per il FII non è stato disponibile per 4 campioni.

^c Per il sequenziamento bi-direzionale I risultato per il FV non è stato disponibile per 8 campioni.

^d WT (wildtype) è normale.

Specificità analitica

Per valutare la specificità analitica del kit Xpert HemosIL FII&FV, sono state sintetizzate delle sequenze con dei SNPs nella regione di legame della sonda sia fuori. La presenza di tali polimorfismi determina un risultato invalido, un risultato corretto è espresso solo con un corretto genotipo.

Sensibilità analitica

Sono stati condotti studi per determinare la quantità minima e massima di campione di sangue intero sia in EDTA che in sodio citrato necessario per avere un corretto risultato. Sono stati analizzati (n = 20) in 8 volumi che variano da 5 µL a 250 µL. Anche se il test può tollerare diversi volumi da 15 µL - 100 µL, 50 µL è il volume del campione raccomandato per ridurre al minimo il rischio di errori derivanti da un campione limitato e in eccesso.

Riproducibilità

Un gruppo di 5 campioni ciascuno con un particolare genotipo è stato testato in duplicato da due diversi operatori su 5 giorni diversi in ciascuno dei tre siti (3 campioni x 2 volte al giorno x 2 operatori per sito x 5 giorni x 3 siti). Sono stati usati diversi kit dello stesso lotto di Xpert HemosIL Fattore II e Fattore V in ciascuno dei 3 siti di test. I test sono stati eseguiti rispettando la procedura Xpert HemosIL FII&FV. Risultati sono riassunti nelle tabelle 2-5.

Pannello di studio:

1. Un campione NORMALE (wildtype) per entrambi gli alleli sia del FII che del FV.
2. Un campione eterozigote per il Fattore II (vale a dire, un allele mutato ed uno wildtype per il fattore II) e con entrambi gli alleli NORMALI (wildtype) per il fattore V;

3. Un campione omozigote per la mutazione del fattore II (vale a dire, due alleli mutanti del gene per il fattore II) e con NORMALI (wildtype) alleli per il fattore V;
4. Un campione con NORMALI (wildtype) alleli per il fattore II e omozigoti per la mutazione del fattore V (vale a dire, due alleli mutanti del gene per il fattore V);
5. Un campione con NORMALI (wildtype) alleli per il fattore II e eterozigoti per la mutazione del fattore V (cioè, un allele mutato l'altro invece wildtype del gene per il fattore V) .

Una sintesi dei risultati da parte del sito è riportata nella tabella 2 e 3. Non vi è stata alcuna differenza statisticamente significativa nei risultati fra il Fattore II ($p = 1.000$) o il Fattore V ($p = 1.000$).

Tableau 2. Sommario della riproducibilità dei risultati per Sito – Fattore II

Campione ID	Sito 1	Sito 2	Sito 3	% Totale Concordanza per Campione
NORMALE	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II ETERO/Fattore V NORMALE	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II OMO/Fattore V NORMALE	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/Fattore V OMO	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/Fattore V ETERO	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Totale Concordanza per sito	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^aNessun risultato discordante. Un solo campione è rimasto indeterminato dopo averlo rieseguito.

Tableau 3. Sommario sulla riproducibilità per Sito – Fattore V

Campione ID	Sito 1	Sito 2	Sito 3	% Totale Concordanza per Campione
NORMALE	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II ETERO/Fattore V NORMALE	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II OMO/Fattore V NORMALE	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/Fattore V OMO	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/Fattore V ETERO	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Totale Concordanza per sito	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^aNessun risultato discordante. Un solo campione è rimasto indeterminato dopo averlo rieseguito.

Una sintesi dei risultati eseguiti dai diversi operatori è riportata nella tabella 4 e 5. Non vi è stata alcuna differenza statisticamente significativa nei risultati fra il Fattore II ($p = 1.000$) o il Fattore V ($p = 1.000$).

Tableau 4. Sommario della riproducibilità dei risultati eseguiti da diversi operatori – Fattore II

Campione ID	Sito 1		Sito 2		Sito 3		% Totale Concordanza da Campione
	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II ETERO/Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II OMO/ Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/ Fattore V OMO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/ Fattore V ETERO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Totale Concordanza per Operatore	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Na Nessun risultato discordante. Un solo campione è rimasto indeterminato dopo averlo rieseguito.

Tableau 5. Sommario di riproducibilità dei risultati eseguito da diversi operatori – Fattore V

Campione ID	Sito 1		Sito 2		Sito 3		% Totale Concordanza da Campione
	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II ETERO/Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II OMO/ Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/ Fattore V OMO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Fattore II NORMALE/ Fattore V ETERO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% Totale Concordanza per Operatorer	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Nessun risultato discordante. Un solo campione è rimasto indeterminato dopo averlo rieseguito.

Per valutare la riproducibilità inter-lotto, i 5 campioni sopra descritti sono stati analizzati due volte al giorno per 5 giorni utilizzando tre lotti, in un unico sito di prove (5 campioni x 2 corse al giorno x 3 lotti 5 giorni). Una sintesi dei risultati da parte di molti è indicata nelle tabelle 6 e 7. Non vi è stata alcuna differenza statisticamente significativa nei risultati tra i lotti sia per Fattore II ($p = 1.000$) che Fattore V ($p = 1,000$).

Tableau 6. Sommario della riproducibilità dei risultati per Lotto – Fattore II

Campione ID	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	% Totale Concordanza per Campione
NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II ETERO/Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II OMO/Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II NORMALE/Fattore V OMO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II NORMALE/Fattore V ETERO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Totale Concordanza per Lotto	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Tableau 7. Sommario della riproducibilità dei risultati per Lotto – Fattore V

Campione ID	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3	% Totale Concordanza per Campione
NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II ETERO/Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II OMO/Fattore V NORMALE	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II NORMALE/Fattore V OMO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Fattore II NORMALE/Fattore V ETERO	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% Totale Concordanza per Lotto	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Bibliografia

1. Thrombophilia as a multigenic disease. B. Zoeller, P.G. de Frutos, A. Hillarp., B. Dahlback. *Haematologica* 1999; 84:59-70.
2. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. V. De Stefano, E. Rossi, K. Paciaroni, G. Leone. *Haematologica* 2002; 87:1095 – 1108.
3. Laboratory investigation of thrombophilia. A Tripodi and P.M. Mannucci. *Clinical Chemistry* 2001; 47:1597 – 1606
4. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Elaine B. Spector, Wayne W. Grody, Carla J. Matteson, , Glenn E. Palomaki, Daniel B. Bellissimo,, Daynna J. Wolff, Linda A. Bradley, , Thomas W. Prior, Gerald Feldman, Bradley W. Popovich, Michael S. Watson, and C. Sue Richards ACMG Standards and Guidelines July/August 2005, Vol. 7, No. 6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, et al. American college of medical genetic consensus statement on factor V leiden mutation testing. *Genetics in Medicine*. 2001;3(2):139-148.

Tabella dei simboli

Tableau 8. Significato dei simboli

Simbolo	Significato
	Numero di catalogo
	Dispositivo medico diagnostico <i>in vitro</i>
	Non riutilizzare
	Attenzione, consultare le istruzioni
	Produttore
	Contiene quantità sufficiente per “n” test
	Controllo
	Marchio CE – Conformità europea
	Rappresentante autorizzato per la Comunità Europea
	Limiti di Temperatura
	Rischio biologico

Produttore

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Phone: +1.408.541.4191

Fax: +1.408.541.4192

Authorized Representative

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00

Fax: +33.563.82.53.01

Distributed exclusively by

 **Instrumentation Laboratory**



Português

Dispositivo médico apenas para diagnóstico *In Vitro*

Nome patentado

Xpert® HemosIL® FII & FV

Nome comum ou usual

Ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Xpert HemosIL Factor II & Factor V

Utilização prevista

O kit de ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V é um teste *in vitro* de genotipagem qualitativa para a detecção dos alelos do Factor II e Factor V em sangue total anticoagulado com citrato de sódio ou EDTA. O teste é realizado no instrumento Cepheid GeneXpert® Dx System e destina-se a fornecer resultados, para as mutações no Factor II (G20210A) e Factor V Leiden (G1691A) como auxiliar no diagnóstico de indivíduos com suspeita de trombofilia.

Resumo e explicação

A associação das mutações do Factor II (20210A) e Factor V (Leiden, 1691A) a um aumento do risco de trombose venosa, está bem documentado^{1, 2, 3, 4}. Na mutação do Factor II (FII) ou mutação da protrombina (20210A), a mutação é uma transição de G para A no nucleótido 20210 na região 3' não transcrita do gene e está associada a níveis plasmáticos de protrombina aumentados. O Factor V (FV) Leiden (1691A) refere-se a uma transição de G para A no nucleótido 1691 do gene FV, resultando na substituição do aminoácido Arginina por Glutamina na proteína FV, causando resistência à clivagem pela proteína C activada (APC).

As mutações FII (20210A) e FV Leiden (G1691A) estão presentes em 2% e 5% da população em geral, respectivamente.⁷

Princípio do Procedimento

O GeneXpert Dx System automatiza e integra a purificação da amostra, a amplificação dos ácidos nucleicos e a detecção da sequência alvo em amostras de sangue total com o ensaio RT-PCR em tempo-real. Este sistema consiste num instrumento, computador pessoal, scanner manual de código de barras e software pré-carregado para analisar testes e visualizar os resultados. O sistema requer a utilização de cartuchos descartáveis de uso único que têm os reagentes PCR e onde decorre o processo de PCR. Como os cartuchos são auto-contidos, a contaminação cruzada entre amostras é eliminada. Para uma descrição completa do sistema, consulte o *GeneXpert Dx System Operator Manual*.

O ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V inclui reagentes para a detecção dos alelos normais e mutantes do Factor II e do Factor V, a partir de sangue total anticoagulado. Cada cartucho de ensaio, utiliza um Probe Check Control (controlo de verificação de sonda) (PCC), que verifica a re-hidratação do reagente, o enchimento do tubo de PCR no cartucho, integridade da sonda e estabilidade do corante.

Os primers e as sondas no ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V determinam o genótipo do gene Factor II (na posição 20210) e/ou gene do Factor V (na posição 1691).

Reagentes e Instrumentos

Material fornecido

 O kit de ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V contém reagentes suficientes para processar 10 amostras ou amostras de controlo de qualidade. O kit contém o seguinte:

- cartuchos do ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V com 10 tubos de reacção integrados
- esfera 1 (seca por congelamento) 1 por cartucho
 - Polimerase
 - dNTPs
 - BSA (albumina sérica bovina)
- esfera 2 (seca por congelamento) 1 por cartucho
 - Primers
 - Sondas
 - BSA (albumina sérica bovina)
- Reagente 1 (tampão Tris, EDTA, Tween® 20) (TET) 3,0 mL por cartucho
- Reagente 2 (tampão Tris, GHCl, Sarkosyl, Tween 20) (GHCL) 3,0 mL por cartucho
- CD
 - Ficheiro de definição do ensaio (ADF)
 - Instruções para importar o ADF para o software GX
 - Folheto informativo

Conservação e Manipulação

- 
- Conserve os cartuchos e os reagentes do ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V a 2-28 °C.
 - Não utilize cartuchos fora do prazo de validade.
 - Não abra um cartucho até estar pronto para realizar o teste.
 - Utilize o cartucho no período de 30 minutos depois de abrir a tampa.

Materiais necessários mas não fornecidos

- GeneXpert Dx System (nº de catálogo varia com a configuração): instrumento GeneXpert, computador, varinha leitora de código de barras e Manual do operador GeneXpert Dx System
- Nota: o nº de catálogo do The GeneXpert Dx System varia com a configuração. Contacte a Cepheid para obter a configuração desejada e o nº de catálogo correspondente.
- Software GeneXpert Dx versão 4.0 ou posterior.
 - Pipete para dispensar 50 µL de sangue anticoagulado com EDTA ou citrato de sódio com pontas de pipeta com filtro resistentes a aerossóis.
 - HemosIL FII & FV DNA Control, ref. P/N 0020003500.

Avisos e Precauções



- Nocivo se for ingerido (R22), Irritante para os olhos e a pele (R36/38).
- Trate todas as amostras biológicas, incluindo os cartuchos utilizados, como capazes de transmitir agentes infecciosos. Como é muitas vezes impossível saber quais podem ser infecciosas, todas as amostras biológicas devem ser tratadas com precauções universais. As linhas de orientação para manipulação de reagentes estão disponíveis no U.S. Centers for Disease Control and Prevention⁵ and the Clinical and Laboratory Standards Institute (anteriormente, National Committee for Clinical Laboratory Standards).⁶
- Siga os procedimentos de segurança da sua instituição para trabalhar com compostos químicos e manipular amostras biológicas.
- Use os cartuchos antes do fim do prazo de validade indicado no kit.
- Não abra a tampa do cartucho do ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V, excepto quando adicionar amostra.
- Não utilize um cartucho que caiu ou foi agitado depois de ter adicionado a amostra.

- Não utilize um cartucho que tem um tubo de reacção danificado (ex. dobrado ou partido).



- Cada cartucho de uso único do ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V é utilizado para processar um teste. Não torne a utilizar cartuchos gastos.
- Consulte o pessoal responsável pelos resíduos ambientais da instituição para obter informações sobre a eliminação adequada dos cartuchos usados e dos reagentes não utilizados. Este material pode apresentar características de resíduos perigosos de acordo com a lei federal "Resource Conservation and Recovery Act" (RCRA - Lei da Recuperação e Conservação dos Recursos) da Associação de Protecção Ambiental (Environmental Protection Agency) dos EUA e deve cumprir os requisitos específicos sobre eliminação. Consulte os regulamentos locais e estatais, podem diferir dos regulamentos de eliminação federais. As instituições fora dos EUA, devem consultar os requisitos sobre a eliminação ambiental de resíduos perigosos do país.



- Conserve o kit de ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V a 2-28 °C.
- Não abra a tampa do cartucho até estar pronto para realizar o teste.
- Se ocorrer um aumento da pressão interna acima do limite pré-determinado pelo fabricante, a análise aborta automaticamente e será notificado um resultado de ERROR (erro).
- As fichas de segurança para todos os reagentes fornecidos com este ensaio estão disponíveis por solicitação ao Cepheid Technical Support e encontram-se no sites da Cepheid (www.cepheid.com e www.cepheidinternational.com).
- A albumina sérica bovina (BSA) deste produto foi exclusivamente produzida com plasma bovino com origem nos EUA. O fabrico da BSA também decorreu nos EUA. Nenhuma proteína de ruminante ou outra proteína animal foi administrada aos animais; os animais passaram em testes pré e pós mortem. Durante o processamento, não houve mistura do material com outros materiais de origem animal.

Colheita e conservação de amostras



Para obter amostras adequadas, siga escrupulosamente as instruções desta secção.

1. Apenas profissionais treinados e habilitados devem colher sangue em tubos anticoagulantes com EDTA ou citrato de sódio.
2. O sangue deve ser processado no período de 24 horas, quando conservado à temperatura ambiente (22-28 °C). As amostras devem ser conservadas entre 2-8 °C, por períodos superiores a 24 horas. O sangue é estável até 15 dias, desde que conservado a -20 °C ou -80 °C, até 3 meses.
3. Deixe que o sangue congelado, descongele à temperatura ambiente durante 3-5 minutos, antes de o inserir no cartucho.

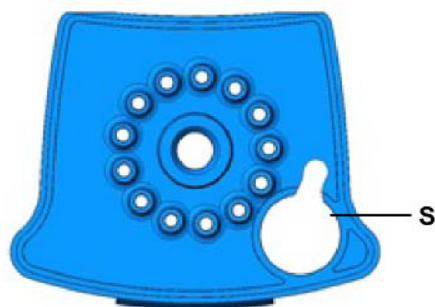
Deixe o sangue congelado equilibrar a temperatura ambiente, descongelando completamente. Não é recomendado congelar/descongelar o sangue mais do que 2 vezes.

4. Misture a amostra invertendo 5 vezes, antes de a colocar no cartucho.

Procedimento

Cuidados

Important: Inicie o teste no período de 15 minutos após adição da amostra ao cartucho



S = Amostra

Figure 1. Cartucho do ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V (vista de cima)

Para adicionar a amostra ao cartucho:

1. Remova o cartucho do kit.
2. Não é necessário que o cartucho esteja à temperatura ambiente antes de utilizar.
3. Faça a mistura invertendo o cartucho várias vezes, até homogeneizar.
4. Abra a tampa do cartucho. Utilizando uma pipeta com uma ponta de filtro resistente a aerossóis, transfira 50 µL de uma amostra de sangue anticoagulado com EDTA ou citrato de sódio para a parede do fundo da abertura “S” do cartucho do ensaio Xpert HemosIL Factor II & Factor V.
5. Feche a tampa do cartucho.

Iniciando o teste

Important: Antes de iniciar o teste, assegure-se que os ficheiros de definição são importados para o software. Os ficheiros estão no CD fornecido.

Esta secção lista os passos básicos para realizar o teste. Para obter instruções detalhadas, consulte o *Manual do operador do GeneXpert Dx System*.

1. Ligue o instrumento GeneXpert Dx e em seguida ligue o computador; o software GeneXpert iniciar-se-á automaticamente.
2. Ligue-se ao GeneXpert Dx System software com o nome de utilizador e palavra passe.
3. Na janela GeneXpert Dx System, clique em **Create Test**. Surge a janela Create Test.
4. Registe o código de barras do cartucho.
5. Na caixa Sample ID, registe com o scanner ou digite a ID da amostra. Assegure-se que digita a ID correcta da amostra. Em alternativa faça scan do código de barras. A ID da amostra está associada aos resultados do teste e surge na janela “**View Results**” e em todos os relatórios.

Create Test

Sample ID* MT01800

Name	Version
Xpert HemosIL Fil	1
Xpert HemosIL Fil	1
Xpert HemosIL FV	1
Xpert HemosIL Fil & FV Combo	1

Select Assay: Xpert HemosIL Fil

Select Module: Xpert HemosIL Fil

Reagent Lot ID*: Xpert HemosIL Fil & FV Combo

Test Type: Specimen

Sample Type: Other

Other Sample Type:

Notes:

Start Test Scan Cartridge Barcode Cancel

Figure 2. Criar a janela de teste

6. No menu "dropdown" do **Select Assay** (seleccionar ensaio), seleccione o ensaio pretendido para a análise.
7. Clique em **Start Test** (Iniciar teste). Na caixa de dialogo apresentada, introduza a sua palavra-passe.
8. Abra a porta do módulo do instrumento com a luz verde a piscar e encha o cartucho.
9. Feche a porta. O teste inicia-se e a luz verde pára de piscar. Quando o teste termina, as luzes apagam-se.
10. Espere até ao sistema libertar o cadeado da porta antes de abrir a porta do módulo e remover o cartucho.

11. Os cartuchos utilizados devem ser eliminados nos contentores adequados para resíduos de amostras, de acordo com as práticas da sua instituição.

Visualização e impressão dos resultados

Para instruções detalhadas sobre como visualizar e imprimir os resultados, consulte o *Manual do operador GeneXpert Dx System*.

CONTROL Controlo de qualidade

Cada ensaio inclui um controlo de verificação da sonda (probe check control-PCC).

Controlo de verificação da sonda (PCC) — Antes do início da reacção de PCR, o GeneXpert Dx System mede o sinal de fluorescência das sondas para monitorizar a re-hidratação das esferas, o enchimento do tubo de reacção, integridade da sonda e estabilidade dos corantes. A verificação da sonda passa se cumpre os critérios de aceitação atribuídos.

Controlos externos — O HemosIL FII & FV DNA Control PN 0020003500 foi concebido e validado para o External QC program (Programa de CQ externo) do Xpert HemosIL FII & FV Assay.

Como alternativa, também podem ser utilizadas amostras de sangue total normal, heterozigótico ou homozigótico para o Factor II/ Factor V (citrato de sódio ou anticoagulante EDTA) para treino, testes de avaliação da preparação e CQ externo do Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay. É necessário material celular. Não utilize DNA extraído. Os controlos externos podem ser utilizados de acordo com os critérios das organizações de acreditação locais, estaduais e federais, conforme aplicável

Interpretação dos Resultados

Os resultados são interpretados pelo GeneXpert Dx System a partir dos sinais fluorescentes medidos e dos algoritmos de cálculo inerentes pra identificar genótipos e surgem nas seguintes janelas de visualização de resultados.

For Xpert HemosIL FII Results (figures 3 through 5).

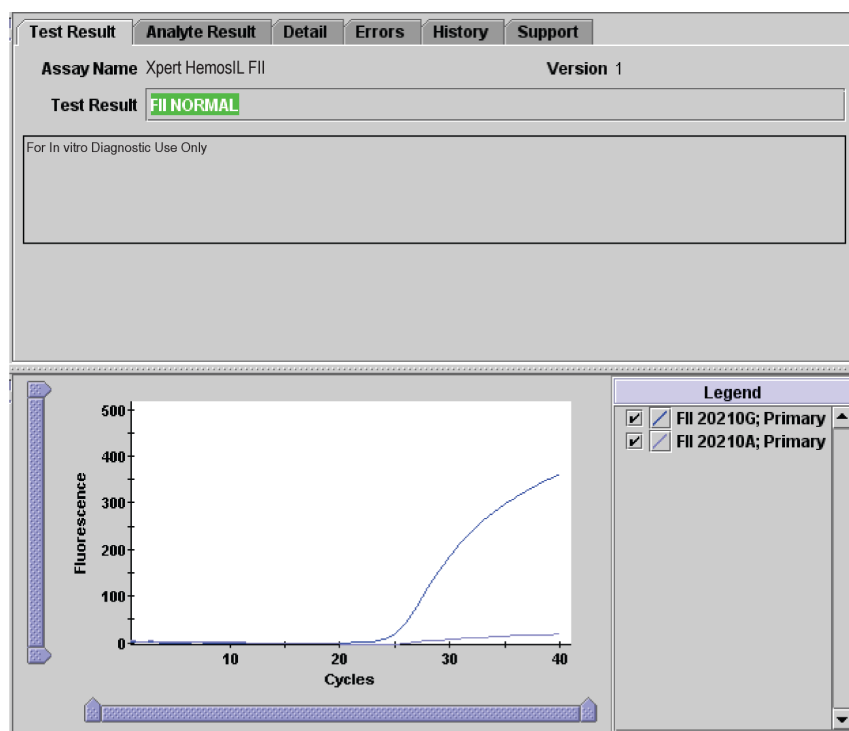


Figure 3. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado normal do Factor II

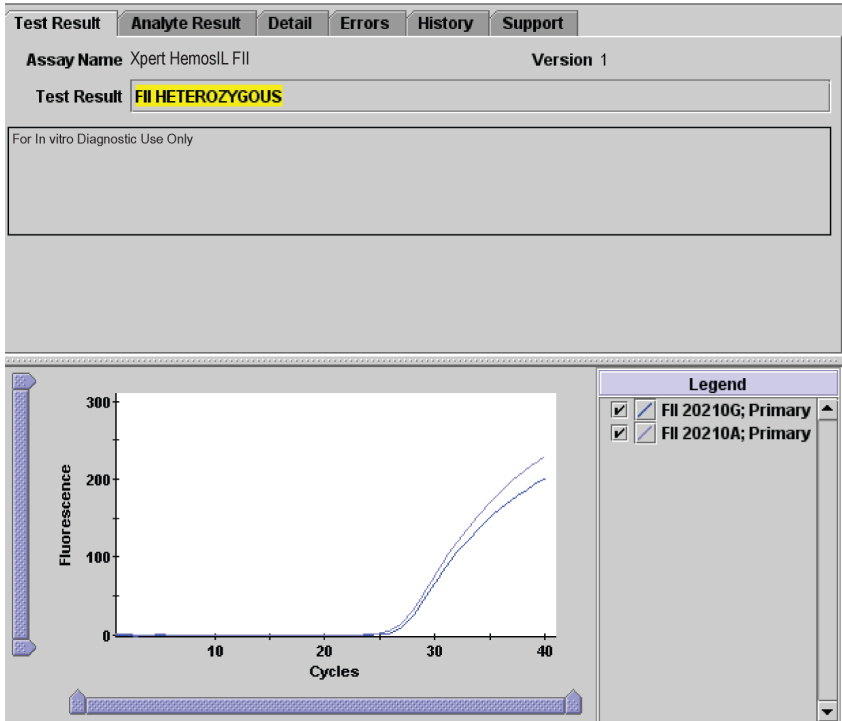


Figure 4. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado do Factor II heterozigótico

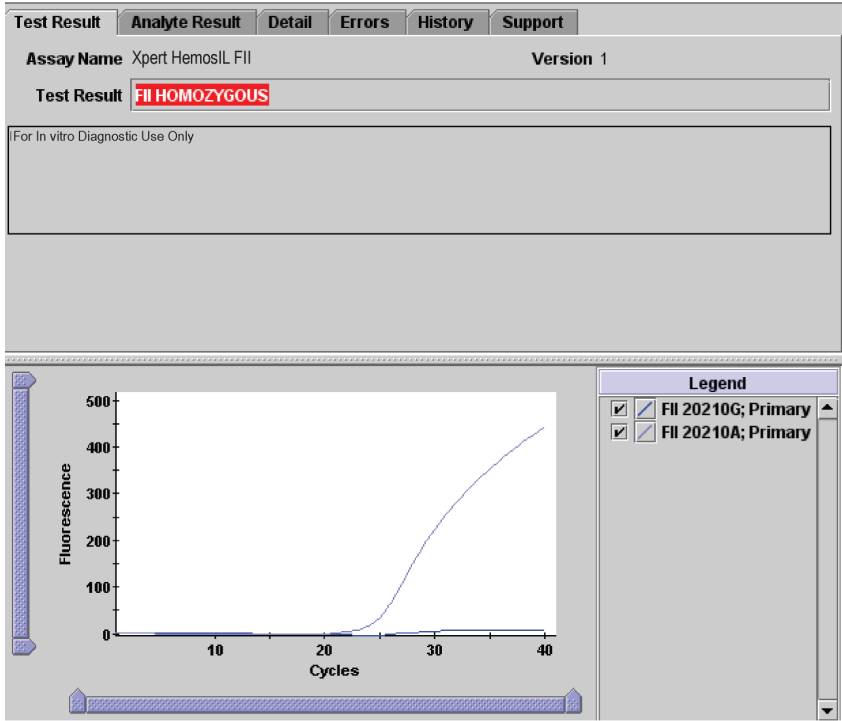


Figure 5. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado do Factor II homozigótico

For Xpert HemosIL FV Results (figures 6 through 8).

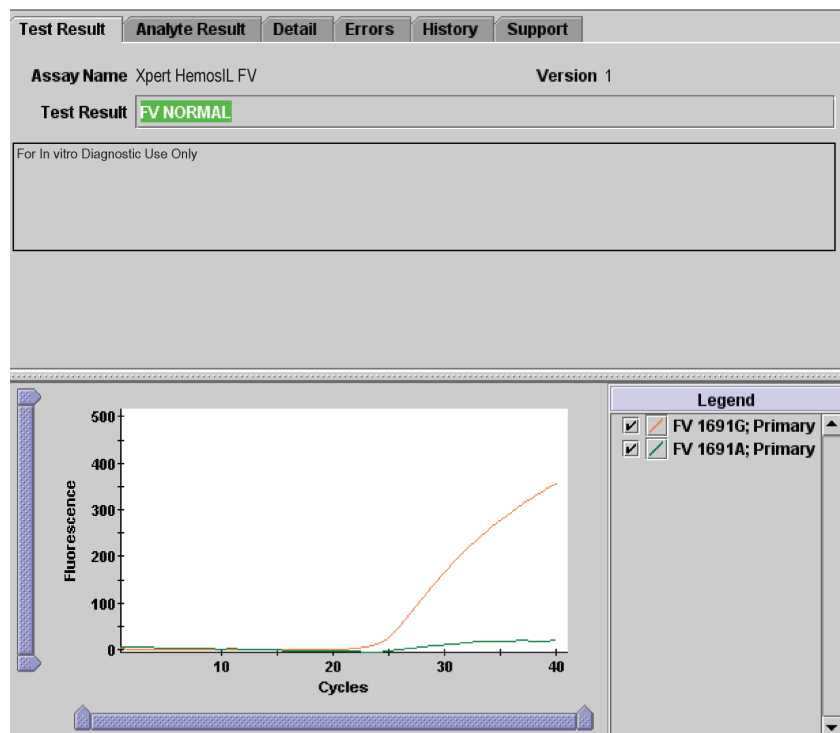


Figure 6. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado normal do Factor V

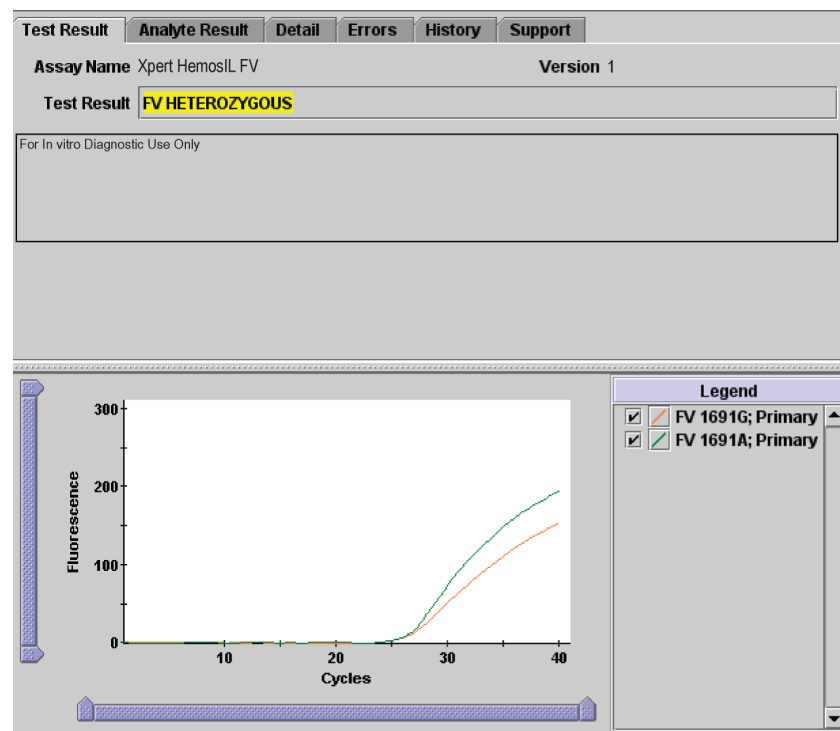


Figure 7. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado do Factor V heterozigótico

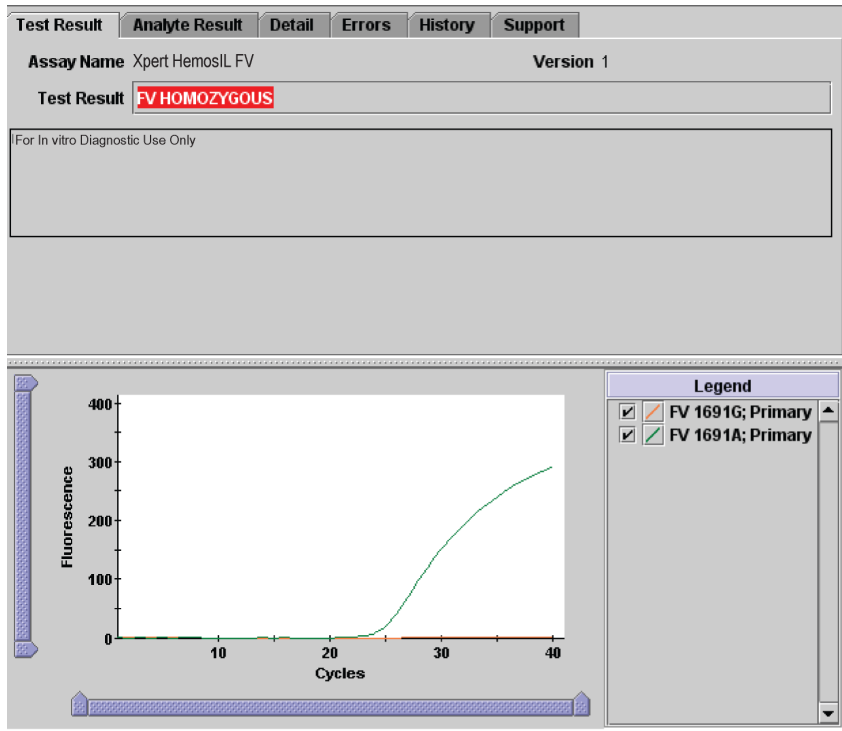


Figure 8. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado do Factor V homozigótico

For Xpert HemosIL FII & FV Combo Results (figures 9 through 11).

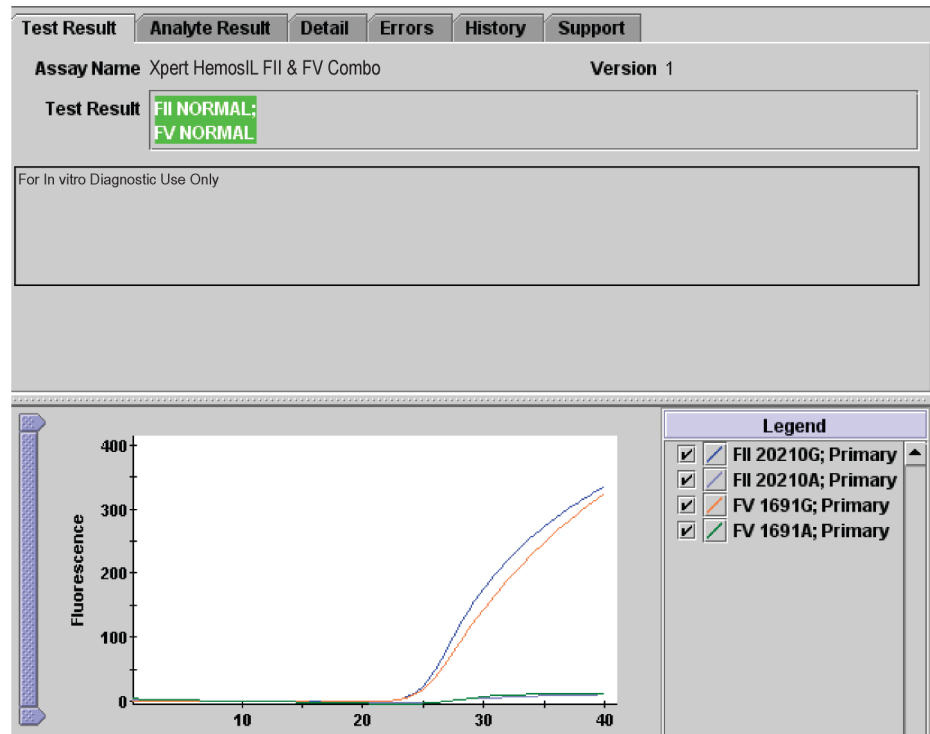


Figure 9. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado normal FII e FV

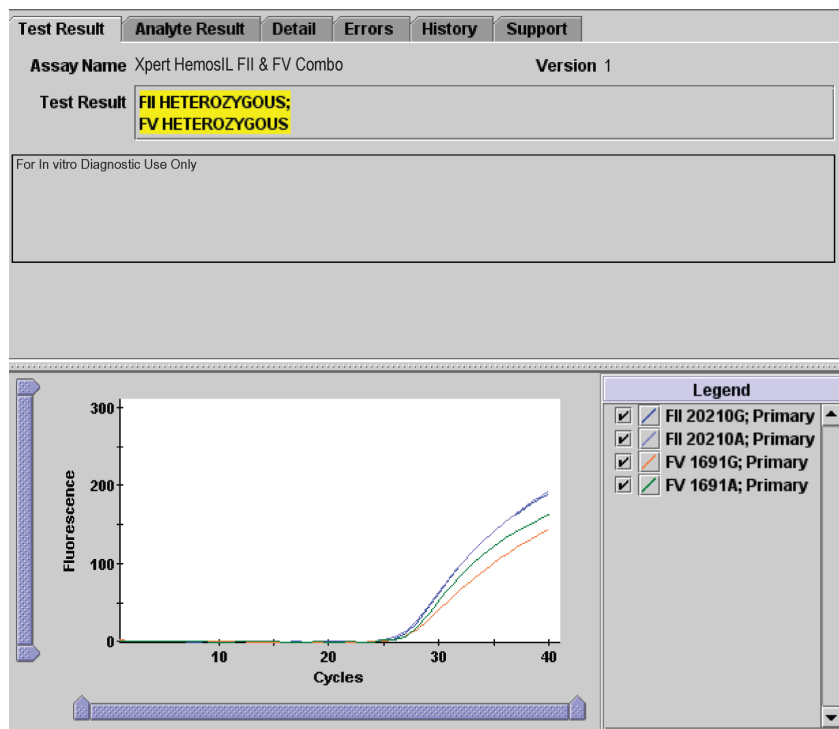


Figure 10. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado FII e FV heterozigótico

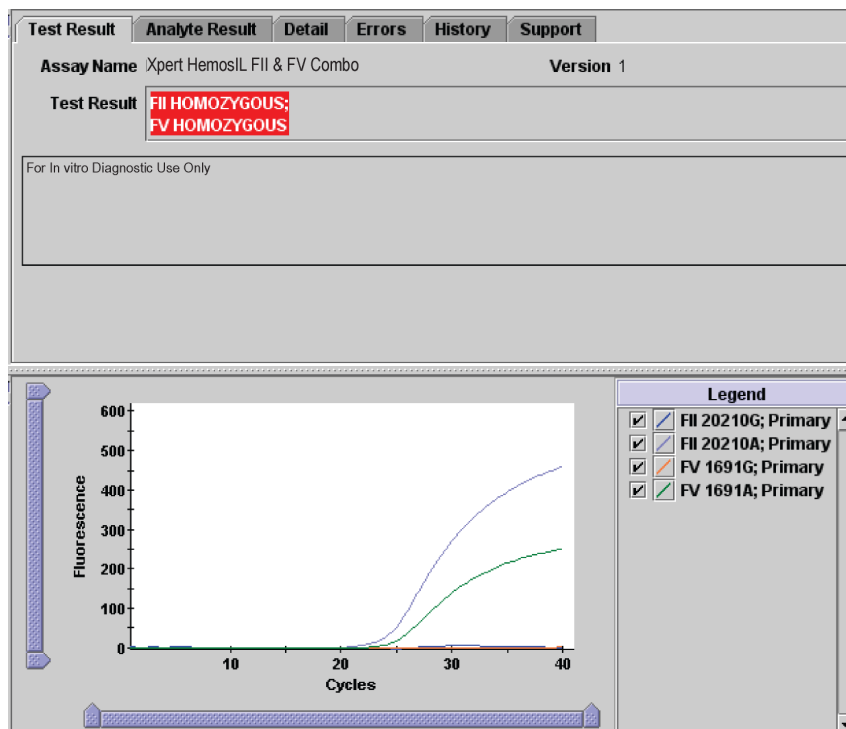


Figure 11. GeneXpert Dx System – Janela de visualização de resultados, resultado FII e FV homozigótico

INVALID

A presença ou ausência dos alelos normal ou mutante do Factor II/Factor V não pode ser determinada, repita o ensaio de acordo com as instruções seguintes. A amostra não foi adequadamente processada ou o PCR foi inibido.

- INVALID—a presença ou ausência dos alelos normal ou mutante do Factor II/Factor V não pode ser determinada.
- Probe Check (verificação da sonda)—PASS; todos os resultados de verificação da sonda passam

ERROR

A presença ou ausência dos alelos normal ou mutante do Factor II/Factor V não pode ser determinada, repita o ensaio de acordo com as instruções seguintes. O Probe Check Control falhou e o ensaio abortou provavelmente, devido ao enchimento inadequado de um tubo de reacção, um problema de integridade da sonda foi detectado, ou porque os limites da pressão máxima foram excedidos ou ainda por falha de um componente do sistema.

- ERROR
- Probe Check (verificação da sonda)—FAIL* (FALHOU); um ou mais resultados da verificação da sonda falharam.

*se a verificação da sonda passou, o erro está a ser causado por uma falha de um componente do sistema.

NO RESULT

A presença ou ausência dos alelos normal ou mutante do Factor II/Factor V não podem ser determinados, repita o ensaio. Os dados recolhidos foram insuficientes (por exemplo, tal pode suceder se, o operador tiver parado um teste que estava em progresso).

- NO RESULT (SEM RESULTADO)
- Probe Check (verificação da sonda)—NA (Não aplicável)

Razões para repetir o ensaio

Repita o ensaio utilizando um novo cartucho (não re-utilize o cartucho), novos reagentes líquidos 1 e 2 e uma nova alíquota de sangue total em citrato de sódio ou EDTA:

- Um resultado INVALID (INVÁLIDO) indica que a amostra não foi adequadamente processada ou o PCR foi inibido.
- Um resultado ERROR (ERRO) indica que o controlo de verificação da sonda falhou e que o ensaio foi abortado, o que se deverá provavelmente ao enchimento inadequado de um tubo de reacção, um problema de integridade da sonda de reagente foi detectado, ou porque os limites da pressão máxima foram excedidos ou ainda porque houve falha de um componente do sistema.
- O NO RESULT (SEM RESULTADO) indica que, os dados recolhidos foram insuficientes. Por exemplo, tal pode suceder se, o operador tiver parado um teste que estava em progresso (a ser realizado).

Limitações

- O desempenho do Xpert HemosIL Factor II & Factor V foi validado utilizando o procedimento fornecido apenas no folheto informativo. As modificações destes procedimentos podem alterar o desempenho do ensaio. Os resultados do ensaio devem ser interpretados juntamente com outros dados clínicos e laboratoriais.
- mutações raras do Factor V (A1696G, G1689A e A1692C) e outras SNPs adicionais na região de ligação da sonda podem interferir com a detecção do alvo e dar um resultado INVALID.

Substâncias Interferentes

Doentes tratados com heparina e transfusões de sangue, podem ter amostras de sangue que interferem potencialmente com os resultados de PCR e levam a resultados inválidos ou errados.

Os estudos de substâncias potencialmente interferentes não demonstraram inibição até 14.3 USP unidades/mL de heparina, 16 mg/dL de bilirrubina, 250 mg/dL de colesterol adicionados, ou 1932 mg/dL de triglicéridos totais (lípidos). Não foi observada qualquer inibição utilizando amostras de sangue total que foram submetidas a um ciclo de congelação-descongelação (sangue hemolizado). Não foi observada significância estatística entre amostras emparelhadas com EDTA ou citrato de sódio.

Valores esperados

As mutações do Factor II (G20210A) e Factor V Leiden (G1691A) estão presentes em 2% e 5% da população em geral, respectivamente.⁷

Características de desempenho

Desempenho clínico do ensaio Xpert HemosIL

As características de desempenho do Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay foram determinadas num estudo investigacional multicêntrico (7 instituições) comparando o Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay com sequenciação bidireccional.

As amostras incluíam aqueles cujos cuidados de rotina implicavam colheitas de sangue total para analisar o Factor II e/ou Factor V. as amostras foram inicialmente testadas por métodos de rotina utilizados em cada um dos laboratórios participantes e depois foram colhidas alíquotas para estudar o Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay no GeneXpert. O DNA em excesso foi enviado para um laboratório contratado, para sequenciação bidireccional.

O desempenho do Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay foi calculado relativamente aos resultados da sequenciação bidireccional.

Resultados totais

Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay

Foram analisadas 1018 amostras para o Factor II, com o Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay e por sequenciação bidireccional. Foram analisadas 1014 para o Factor V, com o Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay e por sequenciação bidireccional. Para suplementar a dimensão da amostra homozigótica, também foram analisadas seis amostras homozigóticas de DNA genómico para o Factor II e cinco amostras homozigóticas para o Factor V pelo Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay e sequenciação bidireccional. Os resultados são apresentados na Tabela 1.

O Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay demonstrou exactidão total de 99.3% relativamente à sequenciação bidireccional para o Factor II e Factor V.

Tableau 1. Desempenho do Xpert HemosIL vs. Sequenciação Bidireccional

Genótipo	Número testado	Número de atribuições correctas na primeira análise	Número de atribuições inválidas ^a na primeira análise	Concordância na primeira análise	Número de atribuições correctas incluindo a análise de repetição	Número de atribuições inválidas ^a na análise de repetição	Concordância após análise de repetição
Factor II G20210A							
WT ^d	968	927	41	95.8%	963	5	99.5%
HET	50	48	2	96.0%	48	2	96.0%
HOM	7	7	0	100.0%	7	0	100%
Total	1025 ^b	982	43	95.8%	1018	7	99.3%
Factor V G1691A							
WT	895	860	35	96.1%	889	6	99.3%
HET	114	108	6	94.7%	113	1	99.1%
HOM	12	11	1	91.7%	12	0	100.0%
Total	1021 ^c	979	42	95.9%	1014	7	99.3%

^aSem resultados discordantes. Resultados inválidos são resultados ?indeterminate?.

^bResultados de sequenciação bidireccional para o Factor II não foram disponibilizados para 4 amostras.

^cResultados de sequenciação bidireccional para o Factor V não foram disponibilizados para 8 amostras.

^dWT (selvagem) é normal.

Especificidade analítica

Para avaliar a especificidade analítica do Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay, foram sintetizadas sequências génicas normais com polimorfismos de gene único silencioso (SNPs) na região de ligação da sonda, bem como fora dessa região. A presença de SNP adicional na região de ligação da sonda, na maioria dos casos, resultou num resultado inválido. Quando se obteve um resultado válido, o genótipo era o correcto.

A presença de um SNP adicional fora da região de ligação da sonda resultou numa atribuição correcta da genotipagem.

Sensibilidade analítica

Foram efectuados estudos para determinar a quantidade máxima e mínima de input de amostras de sangue total de doentes, com EDTA ou citrato de sódio, necessária para obter o genótipo correcto, de modo a que o limite inferior do intervalo de confiança a 95% para a fracção estimada de “correct call” superior a 95%.

Foram analisadas amostras de sangue anticoaguladas com EDTA e citrato de sódio (n=20) a 8 volumes variando de 5 µL a 250 µL.

Embora o ensaio possa tolerar volumes variáveis de 15 µL - 100 µL, 50 µL é o volume recomendado da amostra para minimizar o risco de erros associados com amostra limitada e em excesso.

Reprodutibilidade

Painel de 5 amostras, consistindo numa de cada tipo de amostra listado a seguir, foi analisado em duplicado por 2 operadores diferentes em 5 dias diferentes, em cada um dos 3 laboratórios (3 amostras x 2 vezes/dia x 2 operadores por laboratório x 5 dias x 3 laboratórios). Um lote de kits de Xpert HemosIL Factor II & Factor V Assay foi utilizado em cada um dos 3 laboratórios. Os ensaios Xpert HemosIL Factor II & Factor V foram realizados de acordo com o procedimento Xpert HemosIL Factor II & Factor V. Os resultados estão resumidos nas Tabelas 2-5.

Painel do estudo:

1. amostra com alelos normais (selvagem) para o Factor II & Factor V;
2. amostra heterozigótica para mutação do Factor II (i.e., um alelo mutante e um selvagem para o gene do Factor II) e com alelos normais (selvagem) para o Factor V;
3. amostra homozigótica para a mutação do Factor II (i.e., dois alelos mutantes para o gene do Factor II) e com alelos normais (selvagem) para o Factor V;
4. amostra com alelos normais (selvagem) para o Factor II e homozigóticos para a mutação do Factor V (i.e., dois alelos mutantes para o gene do Factor V);
5. amostra com alelos normais (selvagem) para o Factor II e heterozigótico para a mutação do Factor V (i.e., um alelo mutante e um selvagem para o gene do Factor V).

Na tabela 2 e 3 está um resumo dos resultados por laboratório. Não há diferença estatisticamente significativa nos resultados entre laboratórios, para qualquer um dos factores- Factor II (p=1.000) ou Factor V (p=1.000).

Tableau 2. Resumo dos resultados de reprodutibilidade por laboratório – Factor II

ID da amostra	Site 1	Site 2	Site 3	% concordância total por amostra
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% concordância total por laboratório	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Sem resultados discordantes. Uma amostra foi indeterminada depois de reanalisada.

Tableau 3. Resumo dos resultados de reprodutibilidade por laboratório – Factor V

ID da amostra	Site 1	Site 2	Site 3	% concordância total por amostra
NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (20/20)	100% (60/60)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (20/20)	100% (20/20)	95.0% (19/20) ^a	98.3% (59/60) ^a
% concordância total por amostra	100% (60/60)	100% (60/60)	98.3% (59/60) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a N Sem resultados discordantes. Uma amostra foi indeterminada depois de reanalisada.

A Tabela 4 & 5 tem o resumo dos resultados por operador Não há diferença estatisticamente significativa nos resultados entre laboratórios, para qualquer um dos factores, Factor II (p=1.000) ou Factor V (p=1.000).

Tableau 4. Resumo dos resultados de reprodutibilidade por Operador – Factor II

ID da amostra	Site 1		Site 2		Site 3		% concordância total por amostra
	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HET/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HOM/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% concordância total por operador	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Sem resultados discordantes. Uma amostra foi indeterminada depois de reanalisada.

Tableau 5. Resumo dos resultados de reprodutibilidade por Operador – Factor V

ID da amostra	Site 1		Site 2		Site 3		% concordância total por amostra
	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	Op 1	Op 2	
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HET/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II HOM/ Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (60/60)
Factor II NOR/ Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	90.0% (9/10) ^a	98.3% (59/60) ^a
% concordância total por lote	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	98.0% (49/50) ^a	99.7% (299/300) ^a

^a Sem resultados discordantes. Uma amostra foi indeterminada depois de reanalisada.

Para avaliar a reprodutibilidade inter-lote, o painel de 5 amostras, acima descrito foi analisado 2 vezes por dia ao longo de 5 dias de análises, utilizando cada um dos 3 lotes, num único laboratório (5 amostras x 2 análises por dia x 3 lotes x 5 dias). Nas Tabelas 6 e 7 surge um resumo dos resultados por lote. Não houve diferença estatisticamente significativa nos resultados, entre lotes, para qualquer um dos factores, Factor II (p=1.000) ou Factor V (p=1.000).

Tableau 6. Resumo dos resultados de reprodutibilidade por lote – Factor II

ID da amostra	Lot 1	Lot 2	Lot 3	% concordância total por amostra
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% concordância total por lote	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Tableau 7. Resumo dos resultados de reprodutibilidade por lote – Factor V

ID da amostra	Lot 1	Lot 2	Lot 3	% concordância total por amostra
NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HET/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II HOM/Factor V NOR	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HOM	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
Factor II NOR/Factor V HET	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (10/10)	100% (30/30)
% concordância total por lote	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (50/50)	100% (150/150)

Referências

1. Thrombophilia as a multigenic disease. B. Zoeller, P.G. de Frutos, A. Hillarp., B. Dahlback. Haematologica 1999; 84:59-70.
2. Screening for inherited thrombophilia: indications and therapeutic implications. V. De Stefano, E. Rossi, K. Paciaroni, G. Leone. Haematologica 2002; 87:1095 – 1108.
3. Laboratory investigation of thrombophilia. A Tripodi and P.M. Mannucci. Clinical Chemistry 2001; 47:1597 – 1606
4. Technical standards and guidelines: Venous thromboembolism (Factor V Leiden and prothrombin 20210G>A testing): A disease-specific supplement to the standards and guidelines for clinical genetics laboratories. Elaine B. Spector, Wayne W. Grody, Carla J. Matteson, , Glenn E. Palomaki, Daniel B. Bellissimo,, Daynna J. Wolff, Linda A. Bradley, , Thomas W. Prior, Gerald Feldman, Bradley W. Popovich, Michael S. Watson, and C. Sue Richards ACMG Standards and Guidelines July/August 2005, Vol. 7, No. 6.
5. Centers for Disease Control and Prevention. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories. Richmond JY and McKinney RW (eds) (1993). HHS Publication number (CDC) 93-8395.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute (formerly National Committee for Clinical Laboratory Standards). Protection of laboratory workers from occupationally acquired infections; Approved Guideline. Document M29 (refer to latest edition).
7. Grody WW, Griffin JH, Taylor AK, et al. American college of medical genetic consensus statement on factor V leiden mutation testing. Genetics in Medicine. 2001;3(2):139-148.

Tabela de Símbolos

Tableau 8. Significado dos símbolos

Símbolos	Significado
	Número de referência
	Dispositivo médico para diagnóstico <i>in vitro</i>
	Não reutilizar
	Cuidado, consultar documentação anexa
	Fabricante
	Contém suficiente para <n> testes
	Controlo
	Marcação CE – Conformidade Europeia
	Representante autorizado na Comunidade Europeia
	Limites de temperatura
	Risco biológico

Fabricante

Cepheid
904 Caribbean Drive
Sunnyvale, CA 94089-1189
USA

Phone: +1.408.541.4191

Fax: +1.408.541.4192

Representante autorizado

Cepheid Europe
Vira-Solelh
81470 Maurens-Scopont
France

Tel: +33.563.82.53.00

Fax: +33.563.82.53.01

Distribuído exclusivamente por

 Instrumentation Laboratory

